

Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie
Fachbereich Pharmazie

**Rekrutierung der
G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2
zum M₃-ACh-Rezeptor**

**Identifizierung des Einflusses von Gα_q und
Erstellung eines kinetischen Modells**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Valerie Wolters

aus Aachen

Marburg 2014

Erstgutachter: **Prof. Dr. Moritz Bünemann**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Jens Kockskämper**

Eingereicht am 14.10.2014

Tag der mündlichen Prüfung am 26.11.2014

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).....	1
1.1.1 Acetylcholin-Rezeptoren (AChR).....	2
1.1.2 Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (M-AChR).....	3
1.1.2.1 Struktur und Funktion des M ₃ -Acetylcholin-Rezeptors	4
1.1.2.2 Pathophysiologie der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren.....	4
1.2 G-Proteine.....	5
1.2.1 G-Protein Klassen	7
1.2.2 G α_q -Proteine	7
1.2.2.1 Struktur von G α_q	8
1.2.2.2 Funktionen von G α_q	9
1.2.2.3 Regulation der G α_q -Aktivität	12
1.2.2.4 Kompartimentalisierung des G α_q -Signals.....	12
1.2.2.5 Physiologie der Signalweiterleitung über G α_q	12
1.2.3 G $\beta\gamma$ -Untereinheiten	13
1.2.3.1 Struktur von G $\beta\gamma$	13
1.2.3.2 Funktionen von G $\beta\gamma$	14
1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	15
1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2)	16
1.3.1.1 Struktur der GRK2	16
1.3.1.2 Beeinflussung der GRK2-Aktivität.....	19
1.3.2 Physiologische Funktionen der GRKs	19
1.4 Interaktionsstudien.....	21
1.4.1 Fluorophore	21

1.4.1.1	Fluoreszenzproteine	22
1.4.2	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)	23
1.4.2.1	FRET-Experimente	24
1.5	Fragestellung	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2	Reagenzien und Enzyme	28
2.1.3	Plasmide	31
2.1.3.1	Klonierungsstrategien	33
2.1.4	Primer	34
2.1.5	Bakterien	35
2.1.6	Eukaryotische Zelllinien	35
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.2.1.2	Mutagenese	37
2.2.1.3	Herstellung von LB-Medium und LB-Agar-Platten	38
2.2.1.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Bakterien.....	38
2.2.1.5	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	39
2.2.1.6	DNA-Präparation (Midi).....	39
2.2.1.7	DNA-Präparation (Mini).....	40
2.2.1.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	41
2.2.1.9	Restriktionsverdau	41
2.2.1.10	Agarosegelelektrophorese.....	42
2.2.1.11	Gelaufreinigung	43

2.2.1.12	Ligation	43
2.2.1.13	Sequenzierung	44
2.2.2	Methoden der Zellkultur	45
2.2.2.1	Zellkultur	45
2.2.2.2	Transiente Transfektion	45
2.2.2.3	Ausplattieren auf Deckgläschen	46
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	47
2.2.3.1	Western-Blot	47
2.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Methoden	50
2.2.4.1	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer	50
2.2.4.2	Translokations-Experimente	57
2.2.5	Statistik und Software	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Einfluss von $G\alpha_q$ auf die Rekrutierung der G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinase 2 (GRK2) zum M_3 -ACh-Rezeptor	59
3.1.1	Einfluss der G_q -Proteine auf die Translokation der GRK2	59
3.1.1.1	G-Protein-bindereduzierte GRK2-Mutanten	60
3.1.2	Agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -ACh-Rezeptor	63
3.1.2.1	Einflussfaktoren auf die Größe des FRET-Signals	68
3.1.2.2	Einfluss der G_q -Protein-Untereinheiten	72
3.1.2.3	GRK2-bindedefiziente Mutante $G\alpha_q$ (P185K)	75
3.1.3	Kinetik der Membrantranslokation der GRK2	76
3.1.4	Interaktion von GRK2 mit $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$	79
3.1.4.1	GRK2- $G\beta\gamma$ -Interaktion	80
3.1.4.2	GRK2- $G\alpha_q$ -Interaktion	81
3.1.4.3	Vergleich der „Onset“- und „Offset“-Kinetik	83

3.1.5	Konzentrations-Wirkungs-Kurven	87
3.1.6	Funktionelle Effekte der $G\alpha_q$ -Bindung an die GRK2	89
3.1.7	Effekte von $G\alpha_q$ auf die Interaktion der GRK2 mit dem M_2 -AChR	94
3.2	Erstellung eines kinetischen Modells der Rekrutierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2 zum M_3 -ACh-Rezeptor	96
3.2.1	Interaktion von $G\beta\gamma$ mit M_3 -AChR	96
3.2.2	Interaktion von $G\alpha_q$ mit M_3 -AChR	103
3.2.3	Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$	104
3.2.4	Konzentrations-Wirkungs-Kurven	111
3.2.5	Kinetik der GRK2-Rekrutierung zum M_3 -ACh-Rezeptor bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen	115
3.3	Ergebnisanhang: Charakterisierung von $G\alpha_q$ (P185K)	120
4	Diskussion	124
4.1	Einfluss von $G\alpha_q$ auf die agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -ACh- Rezeptor	126
4.2	Kinetische Beschreibung der Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -AChR	131
4.3	Schlussfolgerung	135
5	Zusammenfassung	137
6	Summary	139
7	Literaturverzeichnis	141
8	Abbildungsverzeichnis	160
9	Tabellenverzeichnis	165
	Publikationen	167
	Lebenslauf	168
	Erklärung	169
	Danksagungen	170

Abkürzungsverzeichnis

α_{2A} -AR	α_{2A} -adrenerger Rezeptor
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
ANOVA	„analysis of variance“
a.u.	willkürliche Einheiten („arbitrary units“)
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cer	Cerulean
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EC ₅₀	halbmaximal effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERK	Enzymfamilie („extracellular signal-regulated kinases“)
F	Fluoreszenzintensität
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FLAsH	Proteinsequenz („fluorescein arsenical hairpin binder“)
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen
il	intrazelluläre Schleife
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton

LARG	„leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor“
M-AChR	muskarinerger Acetylcholin-Rezeptor
mTurq	mTurquoise
MW	Mittelwert
NE	Norepinephrin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PLC	Phospholipase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RGS	„regulator of G-protein signalling“
RH-Domäne	RGS-homologe Domäne
RhoGTPase	„Ras-homologue-GTPase“
RhoGEF	„RhoGTPase nucleotide exchange factor“
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Messfeld („region of interest“)
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.E.M.	Standardfehler
SI	Signalsequenz
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TM	Transmembrandomäne
wt	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden die größte Gruppe innerhalb der transmembranären Rezeptoren. Sie kommen in großer Vielfalt bei vielen Organismen vor und ermöglichen die spezifische Bindung zahlreicher Liganden an der Außenseite der Zelle. Aktivierte Rezeptoren leiten das Signal an G-Proteine im Inneren der Zelle weiter, die mit zahlreichen Effektor-Proteinen interagieren und dadurch die unterschiedlichsten Effekte vermitteln können. Wichtige Effektoren sind zum Beispiel Rezeptorkinasen, die entscheidend an der Regulation der Signalweiterleitung beteiligt sind. Der Signalweg G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist außerdem Ziel vieler pharmakologisch wirksamer Substanzen und steht im Mittelpunkt der Erforschung neuer pharmakologischer Angriffspunkte. Wichtige Vorteile G-Protein-gekoppelter Rezeptoren als Zielstruktur bestehen in ihrer spezifischen Expression in definierten Zelltypen und der selektiven Interaktion von Ligand und Rezeptor. Das detaillierte Verständnis des Signalwegs ist deshalb sehr wichtig für die Entwicklung spezifischer Arzneistoffe mit möglichst geringem Spektrum an unerwünschten Wirkungen.

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren umfasst mehr als 800 verschiedene Rezeptoren und ist an praktisch allen wichtigen physiologischen Vorgängen beteiligt (Fredriksson et al., 2003). Ihre Aufgabe besteht darin, Signale von extrazellulären Signalmolekülen, wie Neurotransmittern und Hormonen, die die Zellmembran nicht passieren können, ins Innere der Zelle weiterzuleiten. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, durchspannen GPCRs die Membran und stellen sowohl extrazellulär als auch intrazellulär Interaktionsstellen bereit. Ihr strukturelles Hauptmerkmal sind sieben transmembranäre α -Helices, die die Rezeptoren in der Zellmembran verankern (Rosenbaum et al., 2009). Die Transmembrandomänen sind durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbunden. Der N-Terminus bildet eine Schleife in den Extrazellulärraum, während der C-Terminus ins Zellinnere ragt. Für die Bindung des Agonisten sind in den meisten Fällen die extrazellulären Bereiche der Transmembrandomänen verantwortlich. Eine Ausnahme stellen die Glykoprotein-Rezeptoren dar, deren Liganden-Bindestelle im N-Terminus liegt (Fredriksson et al., 2003). An der Interaktion mit den nachgeschalteten Signalmolekülen, den G-Proteinen, sind verschiedene zytoplasmatische Bereiche des Rezeptors beteiligt (Hu et al.,

2010). Durch die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor wird dieser aktiviert. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors (hauptsächlich in TM₃ und TM₄), wodurch die Weiterleitung des Signals an das G-Protein ermöglicht wird (Nygaard et al., 2009). Zur Unterbrechung der Signalweiterleitung spielt insbesondere das GRK-Arrestin-System eine Rolle (Hausdorff et al., 1990). G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) fördern durch Phosphorylierung der aktivierten GPCRs die Bindung von Arrestin, das daraufhin sterisch die Bindung von G-Proteinen verhindert sowie eine Rezeptor-Internalisierung bewirkt (Krupnick und Benovic, 1998). Dieser Mechanismus wird auch als homologe Desensibilisierung bezeichnet. Zusätzlich werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch agonistunabhängig durch andere Kinasen, wie die Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase C (PKC), phosphoryliert, was als heterologe Desensibilisierung bezeichnet wird (Benovic et al., 1985). Die Einteilung der verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann nach unterschiedlichen Systemen erfolgen. Nach phylogenetischen Kriterien können G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in fünf verschiedene Familien eingeteilt werden: Rhodopsin, Sekretin, Adhäsion, Glutamat und Frizzled/Taste2 (Lagerstrom und Schioth, 2008).

1.1.1 Acetylcholin-Rezeptoren (AChR)

Acetylcholin ist ein wichtiger Neurotransmitter im menschlichen Körper. Es ist Überträgerstoff an der Präsynapse von sympathischen Neuronen, an der Prä- und Postsynapse von para-sympathischen Neuronen und an der Motorischen Endplatte (Haga, 2013). Wichtige Strukturmerkmale für die Interaktion mit Acetylcholin-Rezeptoren sind ein quartärer Stickstoff und eine Estergruppe des Liganden. Rezeptoren für Acetylcholin können in den nikotinergen und den muskarinergen Typ unterschieden werden. Nur bei den muskarinergen Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, während nikotinerge ACh-Rezeptoren Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren sind (Wess et al., 2007). Muskarinerge ACh-Rezeptoren werden z.B. auf postganglionären parasympathischen Neuronen und parasympathisch innervierten Organen exprimiert, während nikotinerge ACh-Rezeptoren auf präganglionären Neuronen und Skelettmuskelzellen zu finden sind (Haga, 2013). Für den Neurotransmitter Acetylcholin stehen also auf unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Rezeptoren zur Verfügung. Dadurch kann Acetylcholin eine ganze Bandbreite gewebespezifischer Signale vermitteln.

1.1.2 Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (M-AChR)

Die muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren gehören zur Familie der Rhodopsin-Rezeptoren und werden in fünf verschiedene Typen (M_1 - M_5) unterteilt (Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998). M_1 , M_3 und M_5 gehören zur Klasse der G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren, während M_2 und M_4 G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren sind (siehe Abschnitt 1.2.1.). M_1 , M_4 und M_5 werden überwiegend im ZNS, M_2 und M_3 im ZNS und in der Peripherie exprimiert (Volpicelli und Levey, 2004; Abrams et al., 2006; Haga, 2013). Die Funktion des M_1 -ACh-Rezeptors im ZNS besteht in erster Linie in der zentralen Exzitation. M_2 -ACh-Rezeptoren sind unter anderem am Herzen von Bedeutung, wo sie durch Öffnung von K^+ -Kanälen und Senkung des Ca^{2+} -Einstroms negativ chronotrop, dromotrop und inotrop wirken. M_3 -ACh-Rezeptoren sind auf der glatten Muskulatur und auf exokrinen Drüsen zu finden (Wess et al., 2007).



Abbildung 1: Struktur des M_3 -ACh-Rezeptors (PDB 4DAJ Kruse et al., 2012)

1.1.2.1 Struktur und Funktion des M₃-Acetylcholin-Rezeptors

In dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf G_q-gekoppelte Rezeptoren gelegt und aus diesem Grund der M₃-Acetylcholin-Rezeptor als Modellrezeptor ausgewählt. Die Struktur der inaktiven Form des M₃-Acetylcholin-Rezeptors wurde im Komplex mit Tiotropium aufgeklärt (Abbildung 1, Kruse et al., 2012). Als Liganden-Bindestelle wurden dadurch die Transmembrandomänen (TM) 3-7 identifiziert. An der Interaktion mit den G-Proteinen sind die Verbindung zwischen TM₃ und der zweiten intrazellulären (i₂)-Schleife, die i₂-Schleife, die zytoplasmatischen Bereiche von TM₅ und TM₆ und die Helix 8 beteiligt (Hu et al., 2010).

Die Aktivierung des M₃-ACh-Rezeptors bewirkt in der glatten Muskulatur und bei exokrinen Drüsen eine Kontraktion bzw. gesteigerte Sekretion durch Steigerung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Wess et al., 2007). Auf Gefäßendothelzellen exprimierte M₃-ACh-Rezeptoren führen zur Ausschüttung von Stickstoffmonoxid. Dieses diffundiert daraufhin in die tiefer liegende Gefäßmuskelschicht, bewirkt deren Relaxation und in Folge dessen eine Gefäßdilatation (Wess et al., 2007). M₃-ACh-Rezeptoren, die in den β -Zellen des Pankreas exprimiert sind, sind entscheidend an der Aufrechterhaltung der Glucose-Homöostase beteiligt (Gautam et al., 2006). Im ZNS sollen M₃-ACh-Rezeptoren an der Steuerung von Größenwachstum und Knochenbildung beteiligt sein (Gautam et al., 2009; Shi et al., 2010).

1.1.2.2 Pathophysiologie der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren

Muskarinerge ACh-Rezeptoren sollen pathophysiologisch unter anderem bei Alzheimer, Parkinson, Schizophrenie und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) eine Rolle spielen (Wess et al., 2007). Bei der Entwicklung von Alzheimer ist eine Abnahme von muskarinergen ACh-Rezeptoren im Hippocampus von entscheidender Bedeutung. Obwohl in dieser Region überwiegend M₁-ACh-Rezeptoren exprimiert werden, sollen die Lern- und Erinnerungsfunktionen hauptsächlich über M₃-ACh-Rezeptoren vermittelt werden (Poulin et al., 2010). Bei Vorliegen einer COPD kommt es zu gesteigerter parasymphatischer Aktivierung des Lungengewebes (Coulson und Fryer, 2003). Insbesondere durch M₃-ACh-Rezeptoren wird hierbei eine Kontraktion der glatten Muskelzellen vermittelt (Stengel et al., 2000). Zur Behandlung werden deshalb Rezeptor-Antagonisten, wie Ipratropium oder Tiotropium, eingesetzt, wodurch die verengten Atemwege wieder geweitet werden.

1.2 G-Proteine

G-Proteine sind membrangebundene Proteine, die eine wichtige Funktion bei der Signalweiterleitung von aktivierten GPCRs ins Innere der Zelle übernehmen. Sie bestehen aus drei Untereinheiten, die als α -, β - und γ -Untereinheit bezeichnet werden (Milligan und Kostenis, 2006). Beim Menschen kommen 16 verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten, 5 $G\beta$ - und 14 $G\gamma$ -Untereinheiten vor. Je nach Funktion der α -Untereinheit werden G-Proteine in fünf verschiedene Klassen eingeteilt: G_s , G_i , G_q , $G_{12/13}$ und G_v (Sanchez-Fernandez et al., 2014). Eine genauere Beschreibung der einzelnen Klassen findet sich in Abschnitt 1.2.1.

Um die Signalweiterleitung zu ermöglichen, durchlaufen die G-Proteine einen Zyklus (Abbildung 2), der bei allen Klassen auf die gleiche Weise abläuft (Oldham und Hamm, 2006).

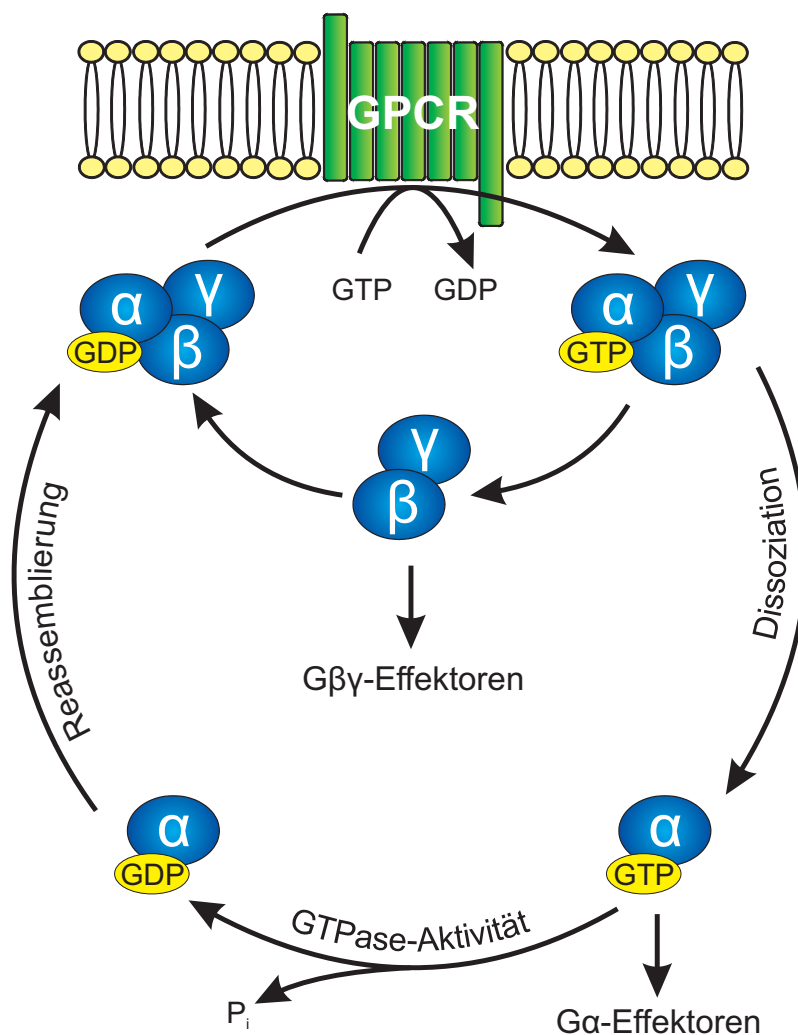


Abbildung 2: Schema des G-Protein Zyklus (modifiziert nach Milligan und Kostenis, 2006)

Nach der Rezeptorstimulation durch einen Agonisten binden die aktivierten Rezeptoren inaktive G-Proteine, deren $G\alpha$ -Untereinheit GDP gebunden hat. Die Rezeptorerkennung des G-Proteins geschieht dabei vorwiegend durch die C-terminale Region der α -Untereinheit (Conklin und Bourne, 1993; Gilchrist et al., 2002). In der Rezeptor-gebundenen Form des G-Proteins ist die Dissoziation von GDP erleichtert. Zusätzlich trägt auch die Interaktion der $\beta\gamma$ -Untereinheit mit der Plasmamembran dazu bei, dass GDP von der α -Untereinheit dissoziiert (Scheerer et al., 2008). Das nukleotidfreie G-Protein bildet einen hochaffinen Komplex mit dem aktivierten Rezeptor (Hommers et al., 2010). Da die GTP-Konzentration in der Zelle etwa 10-mal höher ist als die GDP-Konzentration, bindet die $G\alpha$ -Untereinheit anschließend mit höherer Wahrscheinlichkeit GTP, wodurch das G-Protein aktiviert wird. Nun findet eine Dissoziation beziehungsweise Konformationsänderung der $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit statt und das G-Protein dissoziiert vom Rezeptor (Oldham und Hamm, 2008; Gilman, 1987). Die aktivierten $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten besitzen zahlreiche Interaktionspartner in der Zelle, über die unterschiedliche Effekte vermittelt werden. Die endogene GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit spaltet GTP katalytisch zu GDP. $G\alpha(\text{GDP})$ lagert sich wieder mit $G\beta\gamma$ zum inaktiven G-Protein zusammen und der G-Protein-Zyklus kann erneut beginnen. Durch RGS (regulator of G-protein signalling)-Proteine wird die GTPase-Funktion der $G\alpha$ -Untereinheit und damit die Deaktivierung der G-Proteine beschleunigt.

Die vollständige Dissoziation von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ wurde vermutet, weil verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten die gleichen $G\beta\gamma$ -Untereinheiten teilen können (Quitterer und Lohse, 1999). Auf der anderen Seite wird diskutiert, dass eine Konformationsänderung für die Funktion ausreichend ist, weil dadurch die benötigten Interaktionsstellen zugänglich gemacht werden (Dupre et al., 2009; Rebois et al., 1997). Die Interaktion von inaktivem $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ findet über Bindestellen in der „Switching“-Region und am N-Terminus von $G\alpha$ statt. Die G-Protein-Aktivierung soll die Interaktion über die „Switching“-Region aufheben, während die Bindung des N-Terminus erhalten bleibt (Gibson und Gilman, 2006; Li, 1998). Der Nachweis, dass in Hefezellen auch kovalent gebundene G-Proteine Signale weiterleiten, spricht dafür, dass eine vollständige Dissoziation der Untereinheiten nicht notwendig ist (Klein et al., 2000).

1.2.1 G-Protein Klassen

Wie bereits angesprochen, werden G-Proteine fünf verschiedenen Klassen zugeordnet: G_s , G_i , G_q , $G_{12/13}$ und G_v . Die Klasse der G_s -Proteine (stimulierende G-Proteine) besteht aus $G\alpha_s$ und $G\alpha_{olf}$, wobei $G\alpha_{olf}$ nur in bestimmten olfaktorischen Geweben exprimiert wird (Jones und Reed, 1989). Aktivierte $G\alpha_s$ -Untereinheiten stimulieren Adenylylcyclasen, die daraufhin verstärkt cAMP produzieren (Simon et al., 1991). Das Gegenteil bewirken $G\alpha$ -Untereinheiten der G_i -Protein-Familie (inhibierende G-Proteine). Sie hemmen Adenylylcyclasen und senken den cAMP-Spiegel. Zu dieser Gruppe gehören G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_o , G_t und G_z (Simon et al., 1991). Die Klasse der G_q -Proteine steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und ist in Abschnitt 1.2.2 näher beschrieben. Wichtige Effektoren der $G_{12/13}$ -Proteine sind RhoGEFs („RhoGTPase nucleotide exchange factor“), die die Aktivität der GTPase Rho regulieren (Fukuhara et al., 1999), die G_v -Proteine wurden als fünfte Klasse der G-Proteine erst kürzlich entdeckt (Oka et al., 2009).

1.2.2 $G\alpha_q$ -Proteine

Der Familie der G_q -Proteine sind fünf $G\alpha$ -Untereinheiten zugeordnet: $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$. $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ werden ubiquitär exprimiert und zumindest eine der beiden Untereinheiten kommt in jedem Zelltyp vor (Wilkie et al., 1991). $G\alpha_{14}$ wird in Milz, Niere, Leber, Bauchspeicheldrüse und Lunge exprimiert, während $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$ ausschließlich in hämatopoetischen Zellen und Zellen in frühen Differenzierungsstadien vorkommen (Wilkie et al., 1991; Hubbard und Hepler, 2006; Sanchez-Fernandez et al., 2014). Für $G\alpha_{16}$ konnte gezeigt werden, dass es spezielle Aufgaben in der Differenzierung von Erythroleukämie-Zellen und der Aktivierung von T-Zellen übernimmt (Ghose et al., 1999; Lippert et al., 1997). Effektoren der α -Untereinheiten der G_q -Familie sind PLC β , RhoGEFs und zahlreiche weitere Proteine (Mizuno und Itoh, 2009). Über diese Signalwege vermitteln G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren unter anderem Zellwachstum und Zellproliferation, neuronale Signalweiterleitung, Glucosesekretion, Organisation des Aktin-Zytoskeletts und die Kontraktion von Glattmuskelzellen. Verglichen mit $G\alpha_q$ teilen $G\alpha_{11}$ 90%, $G\alpha_{14}$ 80% und $G\alpha_{16}$ 57% der Aminosäuren (Hubbard und Hepler, 2006). Die Unterschiede bestehen dabei sowohl außerhalb als auch innerhalb der funktionell wichtigen Regionen. So wurden im Vergleich zu $G\alpha_q$ bei $G\alpha_{15/16}$ Substitutionen in der Nukleotid-Bindetasche, der GTPase-Domäne und im C-Terminus gefunden (Wilkie et al., 1991).

1.2.2.1 Struktur von $G\alpha_q$

In dieser Arbeit wurde $G\alpha_q$ für eine genauere Untersuchung herangezogen. Funktionell wichtige Strukturbereiche von $G\alpha_q$ sind N- und C-Terminus, eine helikale Domäne und eine GTPase-Domäne (Abbildung 3).

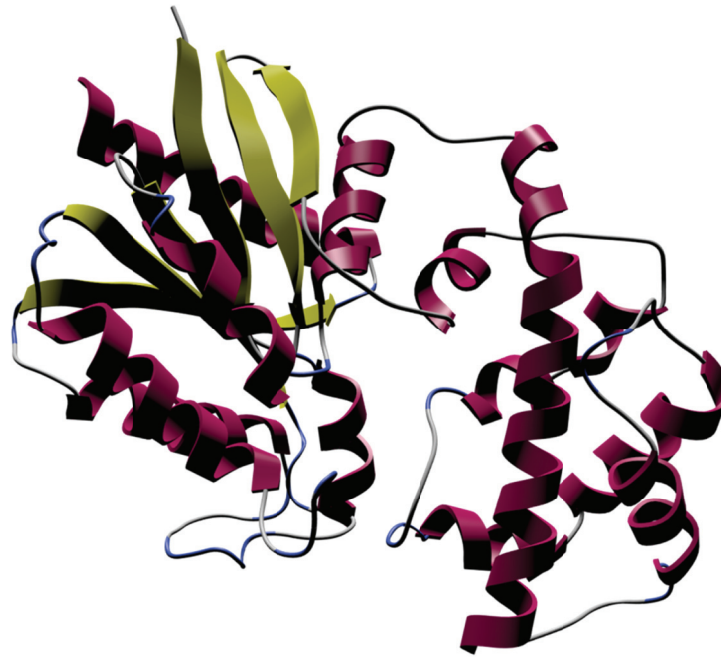


Abbildung 3: Struktur von $G\alpha_q$ (PDB 2BCJ Tesmer et al., 2005)

1.2.2.1.1 N- und C-Terminus

Der N-Terminus von $G\alpha_q$ ist an zwei Cysteinresten palmitoyliert (Linder et al., 1993). Dies bewirkt die Membranverankerung von $G\alpha_q$ sowie seine Lokalisation in bestimmten Mikrodomänen der Membran, wie „Lipid Rafts“ (Wedegaertner et al., 1995; Moffett et al., 2000). Außerdem wird so die Interaktion mit Proteinen und Lipiden erleichtert und die Enzymaktivität von Zielproteinen beeinflusst (Dunphy und Linder, 1998; Smotrys und Linder, 2004). Verstärkt wird die Membranassoziation von $G\alpha_q$ weiterhin durch elektrostatische Interaktion basischer Gruppen im N-Terminus von $G\alpha_q$ mit geladenen Phospholipiden der Membran und die Interaktion mit $G\beta\gamma$, das über eine Prenylierung der γ -Untereinheit in der Membran verankert ist (Kosloff et al., 2002; Evanko et al., 2000). Der C-Terminus von $G\alpha_q$ ist von entscheidender Bedeutung für die Rezeptorinteraktion und Rezeptorselektivität (Gilchrist et al., 2001).

1.2.2.1.2 Helikale Domäne

Die helikale Domäne besteht aus sechs α -Helices, die eine regulatorische Funktion haben und zum Beispiel die Affinität für Nukleotide und die GTPase-Aktivität von $G\alpha_q$ beeinflussen (Echeverría et al., 2000).

1.2.2.1.3 GTPase-Domäne

Die GTPase-Domäne besitzt fünf Schleifen, die für die Nukleotid-Bindung verantwortlich sind, und drei flexible Schleifen, die als „Switch“ I, II, und III bezeichnet werden. Durch die Bindung von GDP oder GTP werden deutliche konformationelle Änderungen in dieser „Switching“-Regionen bewirkt (Sanchez-Fernandez et al., 2014). Die GTPase-Domäne katalysiert die Hydrolyse von GTP zu GDP und ist an der Bindung von $G\beta\gamma$, GPCRs und Effektoren beteiligt. Als Effektor-Bindestelle wurden Teile von „Switch“ II, die Helix α_3 und die Verbindung zum Strang β_5 identifiziert (Sprang et al., 2007). Für PLC β (Waldo et al., 2010), GRK2 (Tesmer et al., 2005) und p63RhoGEF (Lutz et al., 2007) liegen Kristallstrukturen vor, die zeigen, dass die Bindestellen dieser Effektoren überlappen, so dass eine Konkurrenz um die $G\alpha_q$ -Bindung besteht. Auch RGS-Proteine binden an die GTPase-Domäne von $G\alpha_q$, allerdings an anderer Stelle. GRK2 und p63RhoGEF konkurrieren dabei nicht mit RGS-Proteinen um die Bindestelle, so dass auch eine simultane Bindung an $G\alpha_q$ möglich ist. Eine gleichzeitige Bindung von PLC β und RGS-Proteinen ist nicht möglich, da die jeweiligen Bindestellen überlappen.

1.2.2.2 Funktionen von $G\alpha_q$

Die klassische Funktion von $G\alpha_q$ besteht in der Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) (Taylor et al., 1991; Rhee, 2001). Darüber hinaus wurden auch Interaktionen mit RhoGEF Proteinen, wie LARG („leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor“) (Booden et al., 2002) und p63RhoGEF (Lutz et al., 2005; Lutz et al., 2007), Proteinkinase C (PKC) und MEK gezeigt (Garcia-Hoz et al., 2012; Garcia-Hoz et al., 2010).

1.2.2.2.1 Interaktion mit der Phospholipase C β (PLC β)

Die Aktivierung der PLC β war die erste bekannte Funktion von $G\alpha_q$ und ist seither detailliert erforscht (Taylor et al., 1991; Rhee, 2001; Harden et al., 2011). Vier verschiedene Isoformen der PLC β kommen vor und alle können durch $G\alpha_q$ -GTP aktiviert werden. Verursacht wird die Aktivierung durch eine Konformationsänderung einer autoinhibitorischen Schleife im

katalytischen Zentrum der PLC β (Lyon et al., 2011). Im aktiven Zustand spaltet PLC β Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat in die beiden „second messenger“ Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG), was zu einer Verstärkung des G $_q$ -Signals in der Zelle führt. IP $_3$ aktiviert IP $_3$ -Rezeptorkanäle im endoplasmatischen Retikulum und führt zur Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Speichern, während DAG unter anderem die Ca $^{2+}$ -abhängige Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Berridge, 2009). Die PKC aktiviert daraufhin unter anderem ERK1/2 durch RAS-abhängige und RAS-unabhängige Mechanismen. Auch die intrazelluläre Calciumerhöhung kann über eine Rekrutierung der Tyrosinkinase c-Src eine Ras-abhängige ERK1/2-Aktivierung bewirken (Dikic et al., 1996; Nishizuka, 1995).

1.2.2.2.2 Interaktion mit RhoGEF-Proteinen

Zusätzlich wurde eine Interaktion von G α_q mit RhoGEF („Rho-guanine nucleotide exchange factor“)-Proteinen nachgewiesen. Wichtige Beispiele sind hier LARG (Booden et al., 2002) und p63RHoGEF (Lutz et al., 2005; Lutz et al., 2007). LARG enthält eine RGS-Domäne, für die eine Interaktion mit G α_q schon beschrieben wurde (Abschnitt 1.2.2.1). Aber auch ohne diese Domäne ist eine Interaktion mit G α_q möglich. Vergleichbar der PLC β steigert die G α_q -Bindung die Aktivität der RhoGEF-Proteine durch eine Konformationsänderung einer autoinhibitorischen Schleife (Shankaranarayanan et al., 2010). Die Funktion der RhoGEF-Proteine besteht in der Aktivierung von Proteinen der Rho GTPase-Familie, indem sie den Austausch von GDP gegen GTP katalysieren (Bos et al., 2007). Die Familie der Rho GTPasen umfasst eine Reihe von peripheren Membranproteinen, die zelluläre Prozesse wie Zellform, Migration und den Ablauf des Zellzyklus durch eine Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts regulieren (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Außerdem stimulieren sie die Transkription verschiedener Gene durch Transkriptionsfaktoren, wie SRF oder NF κ B.

1.2.2.2.3 Interaktion mit der Phosphoinositid-3-kinase (PI3K)

Im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen Interaktionen besitzt G α_q bei der Interaktion mit der Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) eine überwiegend inhibitorische Funktion. PI3K vermittelt viele Signale, die von Tyrosinkinase-Rezeptoren ausgehen, zum Beispiel der Glucose-Metabolismus und Effekte auf das zelluläre Zytoskelett (Katso et al., 2001). Ein wichtiger Effektor von PI3K ist die Kinase Akt, die unter anderem in die Proteintranslation eingreift. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PI3K und Akt durch IGF-1

(„insuline growth factor 1“) und PDGF („platelet-derived growth factor“) durch Aktivierung des α_1 -adrenerge Rezeptors gehemmt werden kann (Ballou et al., 2000). Außerdem wurde eine direkte inhibitorische Funktion von aktiviertem $G\alpha_q$ gezeigt (Ballou et al., 2003). Allerdings wird die Wirkung von $G\alpha_q$ auf PI3K kontrovers diskutiert und in anderen Quellen wird von einer Aktivierung von Akt durch G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren berichtet (Xie et al., 2000).

1.2.2.2.4 Interaktion mit PKC ζ und MEK5

Aktiviertes $G\alpha_q$ besitzt auch eine Adapterfunktion, indem es spezifisch mit PKC ζ und MEK5 interagiert (Garcia-Hoz et al., 2010). Es bildet sich ein ternärer Komplex, der die Interaktion zwischen PKC ζ und MEK5 fördert und zur Aktivierung von ERK5 („extracellular signal-regulated kinases“) führt. Über diesen Mechanismus kann $G\alpha_q$ durch Beeinflussung der Transkription verschiedener Gene in die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Migration und Apoptose eingreifen (Turjanski et al., 2007). Zusätzlich ist dieser Signalweg an der Entwicklung kardialer Hypertrophie beteiligt (Garcia-Hoz et al., 2012).

1.2.2.2.5 Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs)

GRK2 und GRK3 binden aktivierte $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{14}$ -Untereinheiten, aber keine $G\alpha_{16}$ -Untereinheiten (Carman et al., 1999b; Usui et al., 2000; Day et al., 2003). Durch diesen Mechanismus werden aktivierte $G\alpha$ -Untereinheiten abgefangen, was die Signalweiterleitung über G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren hemmt (Luo et al., 2008). Die Interaktion zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ stand im Vordergrund dieser Arbeit und wird in Abschnitt 1.3.1.1 näher beschrieben. Durch Einfügen der Mutation P185K in die Sequenz von $G\alpha_q$ wird die Interaktion mit GRK2 verhindert (Day et al., 2004).

1.2.2.3 Regulation der $G\alpha_q$ -Aktivität

Die Deaktivierung von $G\alpha_q$ erfolgt durch hydrolytische Spaltung des gebundenen GTP. Dieser Schritt wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha_q$ -Untereinheit katalysiert. GAP-Proteine (GTPase aktivierendes Protein) verstärken die intrinsische GTPase-Aktivität von $G\alpha_q$ und beschleunigen somit diesen Vorgang (Watson et al., 1996). Wichtige Beispiele sind hier die RGS-Proteine. Insbesondere RGS2 und RGS4 sind für die Deaktivierung von $G\alpha_q$ von Bedeutung (Xu et al., 1999). Ihre Funktion beruht darauf, dass sie einen Übergangszustand stabilisieren, der für die GTP-Spaltung entscheidend ist (Tesmer et al., 1997). Zusätzlich regulieren RGS-Proteine über einen allosterischen Mechanismus die Bindeaffinität von $G\alpha_q$ zu p63RhoGEF und GRK2 (Shankaranarayanan et al., 2008). PLC β bindet $G\alpha_q$ auf ähnliche Weise wie RGS-Proteine (Ross, 2011) und führt auch zu einer Beschleunigung der $G\alpha_q$ -Deaktivierung (Berstein et al., 1992). Dieser Mechanismus soll für eine schnelle, aber vorübergehende Aktivierung des G-Proteins verantwortlich sein (Waldo et al., 2010).

1.2.2.4 Kompartimentalisierung des G_q -Signals

Die Zellmembran enthält spezielle cholesterolreiche Mikrokompimente, die als Caveolae bezeichnet werden. Ein wichtiges Strukturprotein der Caveolae ist das Caveolin, das typische Einstülpungen der Membran in diesen Bereichen bewirkt (Sowa, 2012). Caveolae sind unter anderem an der Bildung von Vesikeln beteiligt und organisieren Signalmoleküle (Head et al., 2014). $G\alpha_q$ interagiert mit Caveolin, was zu einer Anreicherung von $G\alpha_q$ in den Caveolae führt (Oh und Schnitzer, 2001). Die Interaktion mit Caveolin wird durch die Aktivierung von $G\alpha_q$ weiter verstärkt, was die Freisetzung von $G\beta\gamma$ fördert und die Dauer des $G\alpha_q$ -Signals verlängert (Sengupta et al., 2008). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Caveolin das durch M_3 -AChR vermittelte G_q -Signal verstärkt und damit zur Funktion von Glattmuskelzellen beiträgt (Bhattacharya et al., 2013).

1.2.2.5 Physiologie der Signalweiterleitung über $G\alpha_q$

Die Signalweiterleitung über $G\alpha_q$ ist unter anderem im kardiovaskulären System von Bedeutung. Stimulation von G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie α_1 -AR, Angiotensin II (AT1)-Rezeptor, Endothelin (ET $_A$)-Rezeptor und Serotonin (5-HT $_{2B}$)-Rezeptor, führen zur Hypertrophie des Herzens (Wettschureck und Offermanns, 2005). Physiologisch beruht dies

auf der Aktivierung der PLC β . Das freigesetzte Ca²⁺ bildet mit Calmodulin einen Komplex, der die Funktion von zahlreichen Proteinen moduliert. Unter anderem kommt es zur Interaktion mit CAMKII und Calcineurin, die beide entscheidend für die Entwicklung der Hypertrophie sind (Mishra et al., 2010). DAG führt zur PKC-Aktivierung und damit Aktivierung von MAP-Kinasen, die das Zellwachstum fördern (Kehat und Molkentin, 2010). Zusätzlich fördert die Interaktion von G α_q mit PKC ζ und MEK5 den MAP Kinase Signalweg, was ebenfalls zur Entwicklung der Hypertrophie beiträgt (Garcia-Hoz et al., 2012). In der Lunge führt eine Stimulation der G $_q$ -Protein-gekoppelten M₃-AChR auf Glattmuskelzellen zur Bronchokonstriktion (Caulfield, 1993; Mishra et al., 2010). Wie bereits erwähnt, kann deshalb die Inhibition dieses Signalwegs therapeutisch bei COPD genutzt werden. Außerdem ist G α_q an der Regulierung der synaptischen Transmission (Offermanns et al., 1997; Wettschureck et al., 2006), dem Zellwachstum, der Thrombozytenaggregation (Simon et al., 1997), Glucosesekretion und Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt.

1.2.3 G $\beta\gamma$ -Untereinheiten

1.2.3.1 Struktur von G $\beta\gamma$

Die β - und γ -Untereinheiten der G-Proteine bilden stabile Dimere, die während des G-Protein-Zyklus nicht dissoziieren. Die G β -Untereinheiten 1-4 sind sehr ähnlich aufgebaut und teilen etwa 80% der Aminosäuren, während G β_5 nur zu etwa 50% mit den anderen vier Isoformen übereinstimmt (Dupre et al., 2009). N-terminal besitzt G β eine α -Helix, der sich eine Domäne aus sieben β -Faltblättern anschließt, die wie ein Propeller angeordnet sind (Dupre et al., 2009).

Die verschiedenen Isoformen der γ -Untereinheit sind nicht so stark konserviert wie die β -Untereinheiten. Alle Isoformen werden posttranslational an einem CAAX-Motiv im C-Terminus mit lipophilen Gruppen modifiziert, über die der G $\beta\gamma$ -Komplex in der Membran verankert wird (Pitcher et al., 1992). Dazu wird der Cysteinrest des CAAX-Motivs isoprenyliert. Zusätzlich befindet sich in X-Position üblicherweise ein Leucinrest, der über eine Thioester-Bindung mit einer Geranylgeranyl-Gruppe versehen wird (Mumby et al., 1990; Simonds et al., 1991).

1.2.3.2 Funktionen von G $\beta\gamma$

G $\beta\gamma$ -Untereinheiten werden einerseits als negative Regulatoren des G α_q -Signals angesehen, da sie die spontane Dissoziation von GDP hemmen (Higashijima et al., 1987). Andererseits besitzen G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aber auch selbst eine Vielzahl an Effektoren.

So aktivieren sie unter anderem den Kaliumkanal Kir3 (Logothetis et al., 1987). An dieser Interaktion ist sowohl die β - als auch die γ -Untereinheit beteiligt und es wurden zahlreiche Bindestellen für G $\beta\gamma$ auf den verschiedenen Untereinheiten des Kanals identifiziert (Zylbergold et al., 2010). Genauso wie G α_q kann auch G $\beta\gamma$ die Phospholipase C β aktivieren (Zhang et al., 1996). Auf Seiten von G $\beta\gamma$ liegt die Bindestelle für PLC β im gleichen Bereich wie die G α_q -Interaktionsstelle, so dass nur freie G $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit der PLC β interagieren können. Auf Seiten der PLC β liegt die Bindestelle in der PH-Domäne (Lyon und Tesmer, 2013). G $\beta\gamma$ -Untereinheiten regulieren außerdem die Adenylylcyclase (Taussig et al., 1994). In Anwesenheit von G α_s aktivieren sie AC2, AC4 und AC7, während sie auf AC1, AC3 und AC8 einen hemmenden Einfluss haben. Für die Interaktion mit AC5 und AC6 ist dagegen nicht vollständig geklärt, ob sie aktivierende oder inhibierende Wirkung haben (Pavan et al., 2009; Gao et al., 2007; Sadana et al., 2009). Die Bindung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten an spannungsabhängige Calciumkanäle wirkt sich inhibierend auf deren Öffnungs-Wahrscheinlichkeit aus, indem sie die Spannungsabhängigkeit zu einer stärkeren Depolarisierung hin verschiebt (Zamponi et al., 1997; Zamponi und Currie, 2013). G $\beta\gamma$ -Untereinheiten interagieren auch mit GRK2 und GRK3, was für die Rekrutierung dieser GRKs zu aktivierten GPCRs von Bedeutung ist (Pitcher et al., 1992). In Abschnitt 1.3.1.1 wird diese Interaktion näher beschrieben. Außerdem konnte eine direkte Interaktion zwischen G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und GPCRs, wie dem M $_3$ -AChR (Wu et al., 2000), dem β_2 -AR (Gales et al., 2005) und Rhodopsin (Phillips und Cerione, 1992), gezeigt werden. Für den M $_3$ -AChR wurde die Region Cys₂₈₉-His₃₃₀ in der dritten intrazellulären Schleife als G $\beta\gamma$ -Bindestelle identifiziert (Wu et al., 2000). Die Bindestelle liegt direkt unterhalb der Position, an der der M $_3$ -AChR durch die GRK2 phosphoryliert wird (³³¹SSS³³³ und ³⁴⁸SASS³⁵¹). Die Interaktion zwischen G $\beta\gamma$ und M $_3$ -AChR ist für eine effiziente Phosphorylierung des Rezeptors erforderlich (Wu et al., 1998). Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass GRK2 und Rezeptor durch die G $\beta\gamma$ -Interaktion in eine geeignete Position zueinander gebracht werden.

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) sind eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die strukturell ähnlich aufgebaut sind. Eingeteilt sind sie in drei Unterfamilien: zur ersten Unterfamilie gehören die beiden visuellen GRKs, GRK1 und GRK7, die zweite Unterfamilie besteht aus GRK2 und GRK3 und in der dritten sind GRK4, GRK5 und GRK6 zusammengefasst (Pitcher et al., 1998). GRK1 und GRK7 sind hauptsächlich in der Retina exprimiert (Weller et al., 1975), während die anderen GRKs ubiquitär vorkommen (Pitcher et al., 1998). Hohe Expressionslevel von GRK4 wurden bisher allerdings nur in den Testes gefunden (Premont et al., 1996). GRKs sind hauptsächlich für ihre Funktion in der Desensibilisierung von GPCRs bekannt. Sie phosphorylieren aktivierte GPCRs an Serin- und Threonin-Resten der dritten intrazellulären Schleife und des C-Terminus (Wu et al., 1998; Krupnick und Benovic, 1998). Dies dient als Signal für die Bindung von Arrestinen, wodurch die Signalweiterleitung entkoppelt wird, indem die Bindung von G-Proteinen sterisch behindert wird (Lohse et al., 1992; Hausdorff et al., 1990). Zusätzlich bewirkt Arrestin die Internalisierung der Rezeptoren, indem es die Clathrin-vermittelte Endozytose der GPCRs erleichtert (Krupnick und Benovic, 1998).

Alle GRKs sind strukturell aus drei Domänen aufgebaut. N-terminal befindet sich eine etwa 150 Aminosäure lange RH-Domäne (RGS-homologe Domäne), gefolgt von einer 330 Aminosäuren langen katalytischen Domäne, die die Kinasefunktion der GRKs enthält, und einer C-terminalen Domäne, die für die Membranlokalisation der GRKs verantwortlich ist (Pitcher et al., 1998). Besonders deutlich unterscheiden sich die verschiedenen GRKs im Aufbau der C-terminalen Domäne. Alle GRKs außer GRK2 und GRK3 sind permanent an der Membran lokalisiert. GRK1 und GRK7 erreichen die Membranverankerung über posttranslationale Prenylierungen am C-Terminus (Inglese et al., 1992; Hisatomi et al., 1998). GRK4 und GRK6 sind an dieser Stelle palmitoyliert (Premont et al., 1996; Stoffel et al., 1994) und GRK5 besitzt ein positiv geladenes Motiv, das eine elektrostatische Interaktion mit geladenen Lipiden der Membran ermöglicht (Pitcher et al., 1996). Die Membranlokalisierung von GRK2 und GRK3 ist dagegen abhängig von der Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Beide GRKs liegen zunächst zytosolisch vor und translozieren erst nach GPCR-Stimulation an die Membran. Es ist beschrieben, dass diese agonistabhängige Membrantranslokation durch die C-terminale PH-Domäne (Pleckstrin-homologe Domäne),

die mit freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten interagiert, sowie eine ebenfalls C-terminale Bindestelle für negativ geladene Membranlipide erreicht wird (Pitcher et al., 1992; Touhara, 1997).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die GRK2, die eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen spielt (Abschnitt 1.3.2). Sie soll im Folgenden genauer eingeführt werden.

1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2)

Entdeckt wurde die GRK2 durch ihre Fähigkeit aktivierte β_2 -adrenerge-Rezeptoren zu phosphorylieren. Deshalb wurde sie ursprünglich auch als β -adrenerge-Rezeptorkinase (β ARK) bezeichnet (Benovic et al., 1986; Benovic et al., 1989). Allerdings spielt die GRK2 nicht nur eine wichtige Rolle bei der sogenannten homologen Desensibilisierung von aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, sondern phosphoryliert auch andere Rezeptoren, wie Tyrosinkinase-Rezeptoren (Hildreth, 2004), und besitzt zahlreiche weitere Interaktionspartner. Für die Regulierung der Signalweiterleitung von GPCRs ist unter anderem wichtig, dass GRK2 mit aktivierten $G\alpha_q$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten interagieren kann (Sallese et al., 2000; Pitcher et al., 1992). Auf diese Weise tritt GRK2 in Konkurrenz zu den Effektoren von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ und hemmt die Signalweiterleitung. Dieser Mechanismus wird auch als phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung des GPCR-Signals bezeichnet (Fernandez et al., 2011; Raveh et al., 2010). Es konnte unter anderem in HEK293T-Zellen gezeigt werden, dass der M_3 -AChR-vermittelte Ca^{2+} -Anstieg durch die GRK2 reduziert werden kann (Luo et al., 2008). Durch eine Kristallstruktur des Komplexes der GRK2 mit den G-Protein-Untereinheiten konnte aufgeklärt werden, dass die GRK2 gleichzeitig mit $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ interagieren kann (Tesmer et al., 2005).

1.3.1.1 Struktur der GRK2

1.3.1.1.1 N-terminale Region

Der N-Terminus enthält eine Bindestelle für Ca^{2+} /Calmodulin, welches die Interaktion mit Rezeptoren und Lipiden verringert und dadurch die Aktivität der GRK2 hemmt (Chuang et al., 1996). Die Funktion der N-terminalen Region ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Teil für die Phosphorylierung von GPCRs von Bedeutung ist (Palczewski et al., 1993; Pao et al., 2009). In diesem Zusammenhang wird

vermutet, dass der N-Terminus eine Helix formt, die mit der Acylphase der Membran interagiert und dazu beiträgt, die GRK2 in der aktiven Form zu halten. In anderen Quellen wird diskutiert, dass der N-terminale Teil zusammen mit dem C-terminalen Bereich der Kinase-Domäne eine Bindestelle für aktivierte Rezeptoren formt (Beautrait et al., 2014).

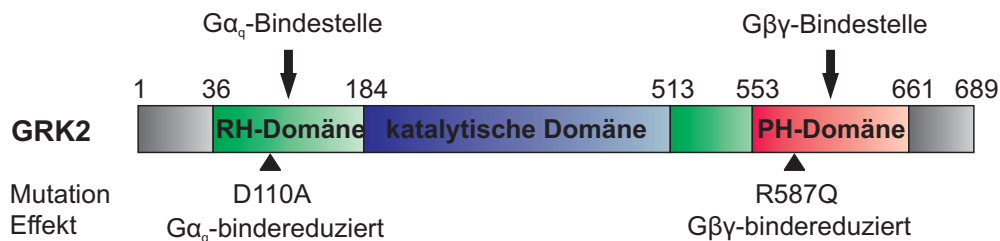


Abbildung 4: Funktionelle Domänen der GRK2

1.3.1.1.2 RGS-homologe Domäne (RH-Domäne)

Die RGS-homologe Domäne der GRK2 wird durch die katalytische Domäne in zwei Teile aufgeteilt. Der N-terminale Teil ist analog zu anderen RGS-Domänen aufgebaut, der C-terminale Teil enthält zwei zusätzliche α -Helices (Lodowski, 2003). Obwohl alle GRKs eine RH-Domäne aufweisen, interagieren nur GRK2 und GRK3 mit aktivierten $G_{\alpha_{q/11}}$ -Untereinheiten (Sallese et al., 2000). Die Bindestelle der GRK2 für G_{α_q} ist dabei nicht die gleiche, die RGS-Proteine nutzen, um mit G_{α_q} zu interagieren („A-site“, Zhong und Neubig, 2001), sondern liegt im Bereich der $\alpha 5$ -Helix und wird „C-site“ bezeichnet (Sterne-Marr et al., 2003). Auch auf Seiten der G_{α_q} -Untereinheit unterscheiden sich die Bindestellen für RGS-Proteine und GRK2 (DiBello, 1998). Beide binden allerdings im Bereich der „switching“-Region von G_{α_q} , was die Selektivität der GRK2 für die aktive Form von G_{α_q} erklärt (Carman et al., 1999b). Die Unterschiede in der Bindung von RGS-Proteinen und GRK2 sind wahrscheinlich die Ursache dafür, dass die GRK2, wenn überhaupt, nur eine schwache GAP-Aktivität besitzt (Carman et al., 1999b). Die Aminosäure Asparagin 110 der GRK2 ist entscheidend für die Bindung von G_{α_q} und ein Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin erzeugt eine G_{α_q} -bindedefiziente GRK2-Mutante (Sterne-Marr et al., 2003).

1.3.1.1.3 Katalytische Domäne

Die katalytische Domäne der GRK2 ist in die RH-Domäne eingebettet und wird durch diese in ihrer aktiven Form stabilisiert (Tesmer, 2009). Im Gegensatz zu anderen AGC-Kinasen muss die GRK2 deshalb nicht an einer Schleife innerhalb der Kinasedomäne phosphoryliert

werden, um ihre Aktivität zu entfalten (Pearce et al., 2010). Allerdings ist die Bindung eines aktivierten Rezeptors an die katalytische Domäne zur Aktivierung erforderlich, denn dies löst eine Konformationsänderung der katalytischen Domäne aus (Chen et al., 1993). Insgesamt ist die katalytische Domäne verglichen mit anderen Serin/Threonin-Kinasen hoch konserviert. Von entscheidender Bedeutung für die Kinasefunktion ist unter anderem Lysin 220. Wenn diese Aminosäure in Arginin mutiert wird, verliert die GRK2 ihre Enzymfunktion und wird als dominant-negative Mutante eingesetzt (K220R) (Kong et al., 1994).

1.3.1.1.4 Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne)

Am C-Terminus der GRK2 befindet sich eine Pleckstrin-homologe Domäne, ein hoch konserviertes Motiv, das in zahlreichen Proteinen der Signalweiterleitung und des Zytoskeletts vorhanden ist (Gibson et al., 1994). Wichtige Funktionen der PH-Domäne sind, wie bereits erwähnt, die Bindung von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und Phospholipiden (Pitcher et al., 1992; Touhara, 1997). Die Bindestelle der $G\beta\gamma$ -Untereinheit für GRK2 überlappt mit der Bindestelle für inaktives $G\alpha_q$, so dass eine gleichzeitige Bindung von GRK2 und $G\alpha_q$ an $G\beta\gamma$ nicht möglich ist (Ford et al., 1998; Lodowski, 2003). Aus diesem Grund ist die Translokation der GRK2 an die Membran agonistabhängig. Erst nach Stimulation des Rezeptors und Aktivierung der G-Proteine wird die Bindestelle für GRK2 frei, und GRK2 wird an die Membran und zu den aktivierten Rezeptoren rekrutiert (Pitcher et al., 1992). Die Translokation der GRK2 an die Membran ermöglicht anschließend die Interaktion der PH-Domäne mit negativ geladenen Phospholipiden der Membran (Carman et al., 2000). Die $G\beta\gamma$ -Bindung und die Interaktion mit Phospholipiden verstärken die Kinaseaktivität der GRK2 auf synergistische Weise (Onorato et al., 1995; DebBurman et al., 1996; Pitcher et al., 1995; Wu et al., 1998). Dies wird einer Konformationsänderung der GRK2 oder einer Verstärkung von intramolekularen Wechselwirkungen zugeschrieben (Sarnago et al., 2003; Lodowski et al., 2005). Für den M_3 -AChR konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Bindung von $G\beta\gamma$ an die dritte intrazelluläre Schleife für eine effektive Phosphorylierung des Rezeptors erforderlich ist (Wu et al., 2000; Wu et al., 1998). Dies weist darauf hin, dass $G\beta\gamma$ nicht nur für die Translokation der GRK2 an die Membran, sondern auch für eine geeignete Positionierung der GRK2 am Rezeptor verantwortlich ist. Die Bindestelle für $G\beta\gamma$ liegt im dritten β -Faltblatt der GRK2 und ein Austausch der Aminosäure Arginin 587 gegen Glutamin führt zu einer $G\beta\gamma$ -bindedefizienten Mutante (Carman et al., 2000).

1.3.1.2 Beeinflussung der GRK2-Aktivität

Wie zuvor erwähnt, ist keine Phosphorylierung der katalytischen Domäne der GRK2 für die Aktivierung ihrer Kinasefunktion notwendig. Dennoch kann die GRK2 durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden, was ihre Kinaseaktivität beeinflusst. Beispiele sind hier unter anderem Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA), die die Kinaseaktivität der GRK2 steigern, sowie ERK („extracellular signal-regulated kinase“), die die Kinaseaktivität hemmt. PKC phosphoryliert GRK2 an der Aminosäure Serin 29, was die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin verhindert und so dessen hemmenden Einfluss aufhebt (Chuang et al., 1995; Krasel et al., 2001). PKA phosphoryliert GRK2 an Aminosäure Serin 685, wodurch die Bindung von $\text{G}\beta\gamma$ gefördert und damit die Translokation der GRK2 an die Membran verstärkt wird (Cong et al., 2001). Die GRK2-Phosphorylierung durch ERK an Aminosäure Serin 670 hemmt die $\text{G}\beta\gamma$ -Bindung und senkt dadurch die Aktivität der GRK2 (Elorza et al., 2000). Gleichzeitig soll die Phosphorylierung durch ERK die Translokation der GRK2 in die Mitochondrien durch die Interaktion mit Hitzeschockprotein 90 fördern (Chen et al., 2013). Die Tyrosinkinase c-Src phosphoryliert GRK2 an unterschiedlichen Tyrosinresten (Sarnago et al., 1999), was die Interaktion mit $\text{G}\alpha_q$ fördert und die Herunterregulierung der Rezeptoren verstärkt (Mariggiò et al., 2006).

Die Aktivität der GRK2 kann allerdings nicht nur über Phosphorylierungen beeinflusst werden. Eine Reihe von Proteinen beeinflussen die GRK2-Aktivität durch direkte Interaktion. Dazu gehört das bereits genannte Calmodulin, dessen Bindung die Kinasefunktion der GRK2 hemmt, und Caveolin 1/3. Caveolin interagiert spezifisch mit der PH-Domäne der GRK2, was zu einer Anreicherung von GRK2 in „Lipid Rafts“ führt und gleichzeitig die Kinaseaktivität der GRK2 hemmt (Carman et al., 1999a). Über diesen Mechanismus wird die gesteigerte Aktivität von $\text{G}\alpha_q$ in Caveolae erklärt (Sengupta et al., 2008).

1.3.2 Physiologische Funktionen der GRKs

GRKs sind für die Physiologie der Zellen von entscheidender Bedeutung und Veränderungen der GRK-Expression sind an der Entwicklung zahlreicher Erkrankungen beteiligt, zum Beispiel Hypertonie, Herzinsuffizienz (Hata und Koch, 2003), Alzheimer und Parkinson (Gurevich et al., 2012).

Die vorherrschenden Isoformen im kardiovaskulären System sind GRK2, GRK3 und GRK5. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der GRK2 einer Herzinsuffizienz etwa 2-3-fach erhöht ist (Penela et al., 2006; Ungerer et al., 1993). Der Entwicklung der Herzinsuffizienz liegt eine anhaltende Überstimulation der β -adrenergen Rezeptoren (β -AR) zugrunde. Um das Herz vor schädigenden Einflüssen der überaktivierten β -AR zu schützen, kommt es zu einer Überexpression von GRK2, die diese Rezeptoren desensibilisiert und herunterreguliert. Auf die daraus resultierende Abnahme der Kontraktilität der Kardiomyocyten reagiert der Körper mit einer gesteigerten Ausschüttung von Katecholaminen. Dadurch wird ein „circulus vitiosus“ ausgelöst, der durch weitere Herunterregulation der β -AR und abnehmende Sensitivität gegenüber Katecholaminen gekennzeichnet ist (Koch et al., 1995). Die Hemmung der GRK2-Aktivität kann diesen Kreislauf durchbrechen und wirkt sich positiv auf eine Kardiomyopathie aus (White et al., 2000). Eine solche Hemmung der GRK2-Aktivität kann durch den Einsatz von β ARK-ct erreicht werden. β ARK-ct ist der C-terminale Teil der GRK2 und kann zum Beispiel über Adenoviren in Zellen eingebracht werden. β ARK-ct konkurriert mit endogener GRK2 um die G β -Bindung und hemmt so kompetitiv die Translokation der GRK2 an die Membran (Koch et al., 1995). Herzinsuffizienz tritt oft in Verbindung mit einer Hypertrophie des Herzens auf. Ein Zusammenhang beider Krankheitsbilder wird in einer gesteigerten G $_q$ -Aktivierung gesehen. Wie zuvor beschrieben, führt die gesteigerte G $_q$ -Aktivierung zur Hypertrophie. Gleichzeitig wird verstärkt die PKC aktiviert, die durch Phosphorylierung die Aktivität der GRK2 steigert. Dies führt wiederum zur verstärkten Desensibilisierung von β -AR, was im Zusammenhang mit einer Herzinsuffizienz steht (Malhotra et al., 2010; Dorn, II. et al., 2000).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass GRK2 auch einen Einfluss auf die Signalweiterleitung von Insulin-Rezeptoren besitzt (Ciccarelli et al., 2011). Eine GRK2-Überexpression schwächt das Insulin-Signal ab und kann so eine Insulinresistenz hervorrufen (Garcia-Guerra et al., 2010). Im Herzen soll die Ursache in der Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates-1 (IRS1) an Serin 307 durch die GRK2 bestehen, was zum Zerfall des Insulinrezeptorkomplexes führt und die Signalweiterleitung zu Effektoren wie Akt und Glucose-Transporter 4 reduziert (Ciccarelli et al., 2011). Außerdem konnte ein Einfluss der GRKs auf das Immunsystem und auf die Entwicklung von Alzheimer und Parkinson nachgewiesen werden (Gurevich et al., 2012).

1.4 Interaktionsstudien

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu untersuchen. Auf biochemischer Ebene ist die Durchführung von „pull-down“-Experimenten mit Zelllysaten möglich. Dabei erfolgt die Identifizierung interagierender Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Um Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu untersuchen, bieten sich Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)-Experimente an, die Aussagen über Distanz- oder Konformationsänderungen zweier fluoreszenzmarkierter Proteine erlauben. Mit diesen Experimenten ist es auch möglich, die Kinetik der Protein-Interaktion zeitlich hoch aufgelöst zu untersuchen.

1.4.1 Fluorophore

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren (Giepmans et al., 2006). So können unter anderem fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt werden, die spezifisch an das zu untersuchende Protein binden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die endogenen Proteine dabei direkt erkannt werden können. Allerdings ist eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen notwendig, damit die Antikörper die Proteine erreichen können. Zusätzlich hängt der Erfolg der Methode davon ab, wie spezifisch die Antikörper an das gewünschte Protein binden. Als Fluoreszenzfarbstoffe werden in diesem Fall üblicherweise kleine organische Fluorophore, wie Fluorescein, oder „Quantum Dots“ eingesetzt. „Quantum Dots“ sind anorganische Nanokristalle, die eine hohe Helligkeit und Photostabilität besitzen (Jaiswal und Simon, 2004).

Gentechnologisch können fluoreszenzmarkierte Proteine erzeugt werden, indem die Gensequenz des zu untersuchenden Proteins mit der Gensequenz eines Fluoreszenzproteins fusioniert wird. Durch Transfektion kann das Konstrukt in Zellen eingebracht und exprimiert werden. Wichtige Vorteile bestehen darin, dass das entsprechende Protein spezifisch markiert und eine Untersuchung in lebenden Zellen möglich ist. Zudem können die Lokalisation und die relative Konzentration des Proteins bestimmt werden. Nachteile sind, dass keine physiologischen Verhältnisse dargestellt werden können, da die fluoreszenzmarkierten Proteine meist überexprimiert sind. Außerdem muss geprüft werden, ob die eingefügten Fluoreszenzproteine die Funktion der untersuchten Proteine beeinträchtigen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung kleinerer Moleküle, die kovalent an bestimmte Proteinsequenzen binden, die gentechnologisch in die zu untersuchenden Proteine eingefügt wurden. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist FLAsH („fluorescein arsenical hairpin binder“) (Griffin et al., 1998). In die zu untersuchenden Proteine wird dazu eine 12 Aminosäuren lange Peptidsequenz inkloniert, die vier Cysteinreste enthält. Die Fluoreszenz entsteht erst nach Chromophorbildung durch kovalente Bindung eines membrangängigen Fluorescein-Derivats mit zwei Arsengruppen. Zu den Vorteilen dieser Methode zählt die geringere Größe des Fluorophors. Allerdings besteht die Gefahr, dass durch das Einfügen der sogenannten „Haarnadel“-Struktur die physiologische Proteinfaltung beeinträchtigt wird. Außerdem entstehen während der Anregung des Fluorophors relativ viele reaktive Sauerstoffspezies, die zur Oxidation des Fluorophors führen. Aus technischen Gründen ist nur die Markierung mit einer Farbe möglich und die Hintergrundfluoreszenz ist höher als bei Verwendung von Fluoreszenzproteinen.

1.4.1.1 Fluoreszenzproteine

In dieser Arbeit wurden Fluoreszenzproteine zur Markierung der untersuchten Proteine eingesetzt. Die am häufigsten eingesetzten Fluoreszenzproteine sind vom GFP (grün fluoreszierendes Protein) abgeleitet. GFP wurde bereits 1962 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura et al., 1962). Zur Verbreitung von GFP in der Fluoreszenz-Mikroskopie kam es allerdings erst 1992 nach der Klonierung des Gens (Prasher et al., 1992). Strukturell bestehen GFP-Derivate aus einem β -Faltblatt-Fass, in dessen Zentrum sich eine α -Helix befindet. Das Chromophor bildet sich posttranslational spontan aus den Aminosäuren 65-67 (Ser-Tyr-Gly) dieser α -Helix. Die Chromophor-Bildung ist dabei ausschließlich von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig und schließt eine Zyklisierung und Oxidation ein (Tsien, 1998). Im Zentrum des Proteins ist das Chromophor vergleichsweise gut vor einem Angriff reaktiver Sauerstoffspezies geschützt, so dass die Photostabilität des Fluoreszenzproteins verglichen mit kleineren Fluoreszenzfarbstoffen sehr hoch ist (Greenbaum et al., 2000).

Durch gezieltes Einführen von Mutationen im Chromophor konnten GFP-Varianten mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren generiert werden (Heim und Tsien, 1996). Beispiele hierfür sind die cyanfarbenen Fluoreszenzproteine eCFP (cyan fluoreszierendes Protein), Cerulean (Rizzo et al., 2004) und mTurquoise (Goedhart et al.,

2010), sowie die gelben Fluoreszenzproteine eYFP (gelb fluoreszierendes Protein), sYFP, Venus (Nagai et al., 2002) und mCitrine (Griesbeck, 2001). Auch Helligkeit, Photostabilität und Proteinfaltung der Fluoreszenzproteine konnte durch die eingeführten Mutationen positiv beeinflusst werden (Pédélec et al., 2005). Die ursprünglichen Fluoreszenzproteine lagen außerdem als Dimere vor, was durch Einführen der Mutation A206K verhindert werden konnte, ohne nachteilige Effekte auf die Fluoreszenz hervorzurufen (Zacharias, 2002). Darüber hinaus wurden GFP-Derivate erzeugt, die durch Einwirkung von Licht das Fluoreszenzspektrum wechseln oder aus einem dunklen in einen fluoreszierenden Zustand gebracht werden können (Jares-Erijman und Jovin, 2003). Ein generelles Problem der GFP-Derivate, wie z.B. YFP, ist ihre Säureempfindlichkeit. Die Varianten Venus und mCitrine sind dabei vergleichsweise pH-resistent (Griesbeck, 2001).

1.4.2 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer wurde 1948 von Theodor Förster quantifiziert (Förster, 1948), zunächst aber nicht wissenschaftlich genutzt. Erst als 1992 mit der Klonierung des GFP-Gens eine Möglichkeit gefunden wurde, Proteine spezifisch mit einem Fluorophor zu markieren, kam es zur verbreiteten Anwendung der FRET-Technologie in der Fluoreszenz-Mikroskopie. FRET ist der strahlungslose Übergang von Energie von einem angeregten Donor auf einen Akzeptor. Der Übergang erfolgt über eine Dipol-Dipol-Kopplung und die übertragene Energie kann vom Akzeptor in Form von Strahlung, aber auch strahlungsfrei abgegeben werden (Miyawaki, 2011).

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6\right]}$$

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-23} F_D k^2 h^{-4} J(1)$$

E_{FRET} FRET-Effizienz

R Abstand zwischen den Fluorophoren

R_0 Förster-Radius (Abstand, bei der 50% der Donor-Fluoreszenz gelöscht ist)

F_D Fluoreszenzquantenausbeute

k^2 Orientierungsfaktor

(bei vollständig zufallsbestimmter Orientierung $\frac{2}{3}$, z.B. für kleine Fluorophore, die frei rotieren können; andere Orientierungsfaktoren bei GFP-Varianten, die durch ihre Position im Protein oft sterisch auf einen bestimmten Bereich beschränkt sind)

h^{-4} Refraktionsindex (beschreibt Einfluss des Mediums)

$J(1)$ Überlappung der Spektralbereiche

Die FRET-Effizienz (E_{FRET}) ist definiert als die Wahrscheinlichkeit einer Energieübertragung pro Donor-Anregung. Sie sinkt mit der sechsten Potenz zum Abstand zwischen den FRET-Partnern. Deshalb ist FRET nur in einem Bereich von etwa 1-10 nm Abstand zwischen den Fluorophoren möglich. Weitere Voraussetzungen für FRET sind eine Überlappung der Spektralbereiche der Emission des Donors und der Absorption der Akzeptors, sowie eine geeignete Orientierung zwischen den Fluorophoren ($k^2 = 0 - 4$). Die FRET-Effizienz ist bei paralleler Dipol-Orientierung am besten.

1.4.2.1 FRET-Experimente

Beruhend auf dem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer wurden unterschiedliche Messmethoden entwickelt, die die Untersuchung verschiedener Fragestellungen ermöglichen.

1.4.2.1.1 Dynamische FRET-Experimente

Zur Durchführung von dynamischen FRET-Experimenten wurden in dieser Arbeit Proteine eingesetzt, deren Gensequenz gentechnologisch mit einem FRET-Donor, meist mTurquoise, bzw. einem FRET-Akzeptor, meist eYFP, versehen war, und durch Transfektion in HEK293T-Zellen eingebracht. Nach Expression der Proteine wurde in einzelnen Zellen der FRET-Donor bei 425 nm angeregt und die Emission von FRET-Donor und FRET-Akzeptor zeitlich hoch aufgelöst detektiert. Wie Abbildung 5 zeigt, bewirkt eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen eine Änderung in der Emission der beiden Fluorophore. Zu Beginn ist der Abstand beider Proteine so groß, dass kein oder wenig FRET besteht. In diesem Fall wird eine hohe Fluoreszenzintensität des Donors gemessen. Im Fall einer Interaktion nähern sich die beiden Fluorophore einander an, so dass ein Energietransfer stattfindet. Dies führt zur Zunahme der Akzeptor-Emission und im Gegenzug zur Abnahme der Donor-Emission.

Zur Auswertung der Experimente wurde das FRET-Ratio $\frac{F_{YFP}}{F_{CFP}}$ berechnet, um Einflussfaktoren, die beide Fluorophore betreffen, zum Beispiel Bleichen, zu eliminieren. Außerdem können unterschiedlich stark exprimierende Zellen auf diese Weise besser verglichen werden. Eine genauere Beschreibung der Durchführung und Auswertung der FRET-Experimente findet sich im Methodenteil (Absatz 2.2.4.1).

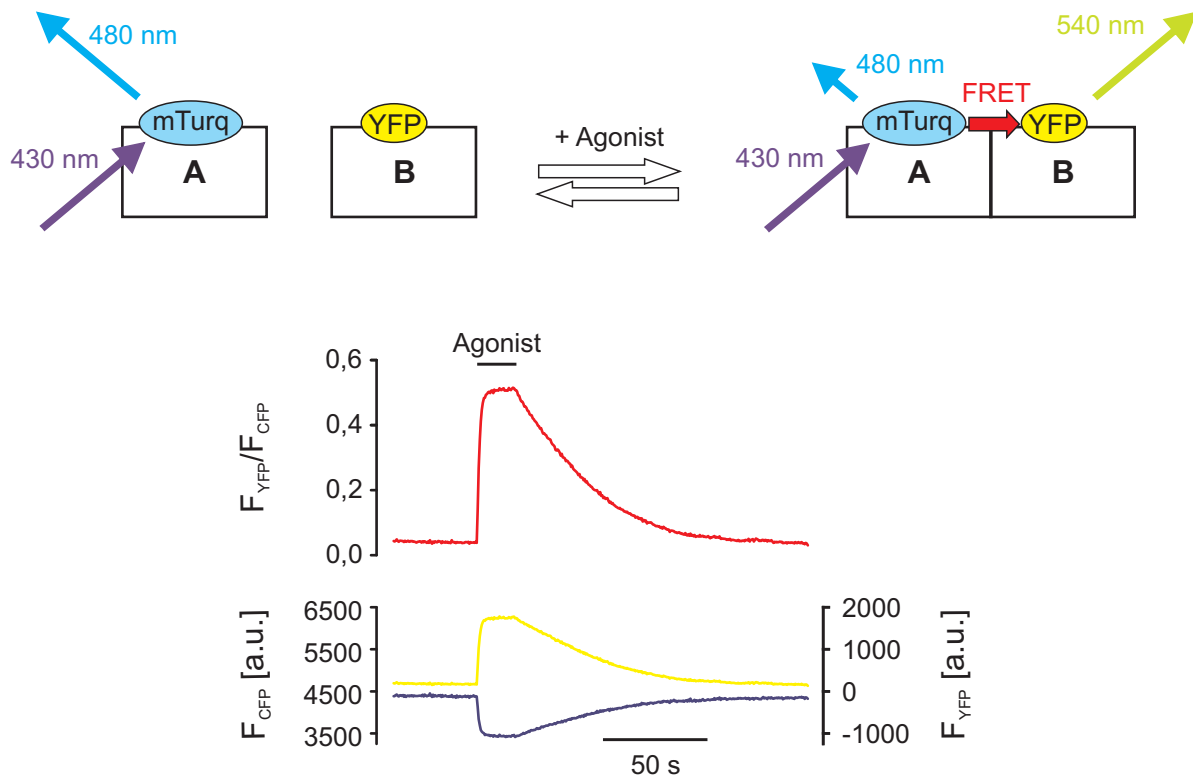


Abbildung 5: Prinzip eines FRET-Experiments

1.4.2.1.2 Intermolekularer und intramolekularer FRET

Intermolekularer FRET ermöglicht es, die Interaktion von zwei Proteinen zu untersuchen. Wie schon beschrieben, werden beide Proteine jeweils mit einem Fluorophor markiert und durch Änderungen in der Emission beider Fluorophore werden in erster Linie Distanzänderungen der beiden Interaktionspartner nachgewiesen.

Mit Hilfe von intramolekularem FRET können dagegen Konformationsänderungen eines Proteins, z.B. eines Rezeptors, untersucht werden. In diesem Fall werden die Fluorophore an unterschiedliche Stellen desselben Proteins eingefügt. Eine Konformationsänderung des Proteins beeinflusst in erster Linie die Orientierung der Fluorophore zueinander, was wiederum an der Emission derselben zu erkennen ist.

Auf diesem Prinzip beruhen auch FRET-Sensoren, wie z.B. der cAMP-Sensor Epac1-camps (Nikolaev, 2004). Die Bindung von cAMP führt zu einer Konformationsänderung des Sensors, so dass aus Änderungen im FRET-Signal Rückschlüsse auf Änderungen der cAMP-Konzentration gezogen werden können.

Insbesondere bei intermolekularem FRET ist das Verhältnis der beiden Fluorophore wichtig, weil dieses das FRET-Signal beeinflusst. Bei intramolekularem FRET ist ein äquimolares Verhältnis der beiden Fluorophore sichergestellt.

1.4.2.1.3 FRET-Experimente im Gleichgewichtszustand

Bei dieser Methode werden keine dynamischen FRET-Änderungen, sondern die FRET-Effizienz zwischen zwei Fluorophoren in An- und Abwesenheit des FRET-Akzeptors gemessen. Um die FRET-Effizienz quantifizieren zu können, müssen geeignete Annahmen gemacht werden. Unter experimentellen Bedingungen ist dies oft schwierig, da viele Größen, wie die Orientierung und Rotationsgeschwindigkeit der Fluorophore und die stöchiometrischen Verhältnisse unbekannt oder starken Schwankungen unterworfen sind (Jares-Erijman und Jovin, 2003).

1.4.2.1.4 Akzeptorbleichen

Die Methode des Akzeptorbleichens kann angewendet werden, um bestehende Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachzuweisen. Die Donor-Fluoreszenz wird in bestimmten Zeitabständen gemessen, während der Akzeptor kontinuierlich durch Belichten mit hoher Lichtintensität geblichen wird. Geblichene Fluorophore können in der Folge keine Energie mehr aufnehmen. Bestand zu Beginn eine Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen und damit FRET zwischen den Fluorophoren, ist nach Akzeptorbleichen kein Energietransfer mehr möglich, was als Zunahme der Donor-Fluoreszenz sichtbar wird.

1.4.2.1.5 FLIM („fluorescence lifetime microscopy“)

FLIM beschreibt eine sehr direkte FRET-Messung, die relativ unempfindlich gegenüber Konzentrationsänderungen und Bleichen der Fluorophore ist. Eingesetzt wird ein FRET-Donor mit hoher FRET-Effizienz und langer Lebensdauer, wie zum Beispiel Cerulean (Rizzo et al., 2004) und mTurquoise (Goedhart et al., 2010). Der FRET-Donor wird mit einem kurzen Lichtimpuls angeregt und die Donor-Fluoreszenz, die monoexponentiell abnimmt, zeitlich verfolgt. Die Anwesenheit eines FRET-Akzeptors führt durch Energieaufnahme zu einer Abnahme der Lebensdauer der Donor-Fluoreszenz.

1.5 Fragestellung

Die Funktion der G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinase 2 (GRK2) in der Desensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist seit langem bekannt und intensiv erforscht. Es wurde beschrieben, dass die Interaktion mit freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und Phospholipiden zur agonistabhängigen Rekrutierung der GRK2 zu aktivierten Rezeptoren führt. Als weiterer Interaktionspartner der GRK2 wurden aktive $G\alpha_q$ -Untereinheiten identifiziert und die Hemmung der Signalweiterleitung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch diese Interaktion beschrieben. Bisherige Studien nutzten zumeist Endpunktmethoden, wie “pull-down”-Experimente oder die Bestimmung der Rezeptorphosphorylierung. Daher fehlte bisher eine detaillierte kinetische Beschreibung der Abläufe, die zur agonistabhängigen Rekrutierung der GRK2 zum Rezeptor führen. Auch war nicht geklärt, welche Funktionen $G\alpha_q$ bei der GRK2-Rekrutierung zu G_q -Protein-gekoppelter Rezeptoren besitzt. Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb zu einem darin, die Effekte der Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und GRK2 auf die Signalweiterleitung am Beispiel des G_q -Protein-gekoppelten M_3 -Acetylcholin-Rezeptors zu untersuchen. Zum anderen sollte die Dynamik der GRK2-Rekrutierung zu aktivierten Rezeptoren mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung in einzelnen lebenden Zellen analysiert und quantifiziert werden. Im Gegensatz zu bisher genutzten Techniken ermöglichte die Methode des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) eine genaue kinetische Analyse aller Vorgänge, die zur Rekrutierung der GRK2 zum Rezeptor und zur Dissoziation der GRK2 vom Rezeptor beitragen. Insbesondere sollten hierbei die Funktion von $G\alpha_q$ bei der agonistabhängigen Membrantranslokation der GRK2 und der Einfluss von $G\alpha_q$ auf die Interaktion von GRK2 mit G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren im Mittelpunkt stehen. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob die Bindung von $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ an die GRK2 die Funktionalität der Kinase und damit die Rezeptorphosphorylierung beeinflusst. Durch diese Untersuchungen sollten wertvolle Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welchen Einfluss $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ durch ihre Interaktion mit der GRK2 auf die Signalweiterleitung und Desensibilisierung G_q -Protein-gekoppelter Rezeptoren besitzen. Die durch die kinetische Analyse gewonnenen Erkenntnisse sollten darüber hinaus zur Erstellung einer computerbasierten Simulation der GRK2-Rekrutierung genutzt werden. Dieses Modell sollte einerseits zur Plausibilitätsprüfung der beschriebenen Vorgänge dienen und andererseits Reaktionskonstanten für die unterschiedlichen einbezogenen Interaktionen liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Lieferant
Deckgläschen (25 mm, rund)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (6 ml)	Neolab, Heidelberg
Eppendorfgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Kulturröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	VWR, Darmstadt
Petrischalen (10 cm)	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen (2 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnbrecht
PVDF Membranen	Roche, Mannheim
6-Well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnbrecht
Whatmanpaper	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen (10 cm, 6 cm)	Sarstedt, Nürnbrecht

2.1.2 Reagenzien und Enzyme

Tabelle 2: Allgemeine Reagenzien und Enzyme

Substanz	Lieferant
Acetylcholiniodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Aktivkohle	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose (LE)	Biochrom, Berlin
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Substanz	Lieferant
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford-Reagenz	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	New England BioLabs, Frankfurt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL-Lösung (Cheluminate-HRP PicoDetect)	Applichem, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immersionsöl (Immersol 518F)	Zeiss, Jena
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
KapaHifi DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen
LB-Medium nach Lennox	Applichem, Darmstadt
1 kb Leiter	New England BioLabs, Frankfurt
T4 Ligase	New England BioLabs, Frankfurt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Lenz-Chemie, Westerbürg
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe

Substanz	Lieferant
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfate (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Noradrenalinbitartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEG 3000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific, Langenselbold
Pfu DNA Polymerase	Thermo Scientific, Langenselbold
Proteaseinhibitor-Mix (cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack)	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Frankfurt
RNaseA	Roche, Mannheim
Salzsäure (37%)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Enzyme für eukaryotische Zellkultur

Substanz	Lieferant
DMEM (high glucose)	Biochrom, Berlin
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
L-Gutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
Poly-L-lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/ EDTA (1:250)	Biochrom, Berlin

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Lieferant
anti-GRK2 (C-15, sc-562), Spezies: Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Actin (clone C4), Spezies: Maus	MP Biomedicals, Eschwege
anti-rabbit (HRP-linked), Spezies: Ziege	Cell Signaling, Leiden
anti-mouse (HRP-linked), Spezies: Pferd	Cell Signaling, Leiden

2.1.3 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, außer CFP-Gr₂, basieren auf dem pcDNA3-Vektor. Dieser Expressionsvektor für Säugetierzellen (Invitrogen) enthält eine „multiple cloning site“ mit diversen Schnittstellen für die Klonierung, einen CMV-Promotor für eine starke Expression des eingefügten Gens in eukaryotischen Zellen und eine Ampicillin-Resistenz für die Selektion von Bakterien (Abbildung 6).

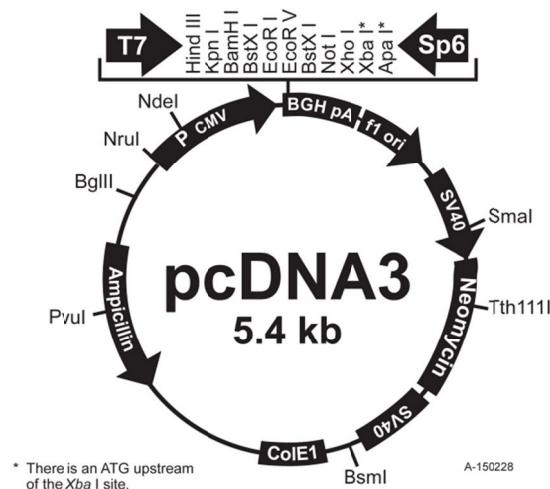


Abbildung 6: Plasmidkarte von pcDNA3 (Produktionform von Invitrogen)

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Die bereits im Labor vorhandenen Plasmide sind mit der entsprechenden Referenz gekennzeichnet. Zu den in dieser Arbeit neu klonierten Plasmiden ist in Abschnitt 2.1.3.1 die Klonierungsstrategie beschrieben.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Spezies	Vektor	Referenz
M ₃ -AChR	Mensch	pcDNA3	Missouri S&T cDNA Ressource Center (www.cdna.org), #MAR030TN00
M ₃ -AChR-YFP	Mensch	pcDNA3	(Hoffmann et al., 2012)
M ₃ -AChR-mTurq	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
M ₂ -AChR-CFP	Mensch	pcDNA3	zur Verfügung gestellt von Peter Hein
α_{2A} -AR	Maus	pcDNA3	(Bünemann et al., 2003)
G α_q	Maus	pcDNA3	(Hughes et al., 2001)
G α_q -YFP	Maus	pcDNA3	(Hughes et al., 2001)
G α_q (P185K)	Maus	pcDNA3	diese Arbeit
G α_q (P185K)-YFP	Maus	pcDNA3	diese Arbeit
G α_{i1} C351I	Ratte	pcDNA3	(Wise et al., 1997)
G α_{i1} -YFP C351I	Ratte	pcDNA3	(Bünemann et al., 2003)
G α_o	Ratte	pcDNA3	(Frank et al., 2005)
G β_1	Mensch	pcDNA3	(Bünemann et al., 2003)
Cer-G β_1	Mensch	pcDNA3	(Frank et al., 2005)
G γ_2	Rind	pcDNA3	(Bünemann et al., 2003)
CFP-G γ_2	Rind	N1-eCFP (Clontech)	(Bünemann et al., 2003)
GRK2	Mensch	pcDNA3	(Winstel et al., 1996)
GRK2-YFP	Mensch	pcDNA3	(Brockmann, 2005)
GRK2-mTurq	Mensch	pcDNA3	zur Verfügung gestellt von Cornelius Krasel
GRK2 (K220R)	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
GRK2 (K220R)-YFP	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
GRK2 (K220R)-mTurq	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
GRK2 (D110A)	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
GRK2 (D110A)-YFP	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit

Plasmid	Spezies	Vektor	Referenz
GRK2 (D110A)-mTurq	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
GRK2 (R587Q)	Mensch	pcDNA3	zur Verfügung gestellt von Cornelius Krasel
GRK2 (R587Q)-YFP	Mensch	pcDNA3	zur Verfügung gestellt von Cornelius Krasel
GRK2 (R587Q)-mTurq	Mensch	pcDNA3	zur Verfügung gestellt von Cornelius Krasel
GRK2 (D110A + R587Q)	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
GRK2 (D110A + R587Q)-YFP	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
GRK2 (D110A + R587Q)-mTurq	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
Arrestin3-YFP	Rind	pcDNA3	(Krasel et al., 2005)
Arrestin3-mTurq	Rind	pcDNA3	zur Verfügung gestellt von Cornelius Krasel
pcDNA3		pcDNA3	Invitrogen
SI-eYFP- β_2 -AR-mTurq	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
SI-eYFP- β_2 -AR-Cer	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit
SI-eYFP β_2 -AR-CFP	Mensch	pcDNA3	diese Arbeit

2.1.3.1 Klonierungsstrategien

Die Klonierung der unterschiedlichen GRK2-Mutanten erfolgte ausgehend von GRK2, GRK2-YFP, GRK2-mTurq und den entsprechenden R587Q-mutierten Konstrukten durch Mutagenese mit den in Abschnitt 2.1.4 aufgeführten Primern. Der Ablauf einer Mutagenese ist in Abschnitt 2.2.1.2 näher beschrieben. Ebenfalls durch Mutagenese wurden $G\alpha_q$ (P185K) und $G\alpha_q$ (P185K)-YFP aus $G\alpha_q$ und $G\alpha_q$ -YFP erzeugt.

Unter Verwendung der beiden Ausgangsplasmide M_3 -AChR-YFP und GRK2-mTurq wurde M_3 -AChR-mTurq kloniert. Dazu wurde durch Restriktion mit den Enzymen XbaI und NotI jeweils die Gensequenz des Fluorophors aus den Plasmidvektoren herausgeschnitten und der M_3 -AChR-Vektor mit mTurq ligiert. Eine detaillierte Beschreibung des Restriktionsverdaus und der Ligation befindet sich in den Abschnitten 2.2.1.9 und 2.2.1.12.

Die Klonierung der Referenzplasmide SI-eYFP- β_2 -AR-mTurq, SI-eYFP- β_2 -AR-Cer und SI-eYFP- β_2 -AR-CFP erfolgte analog zum Konstrukt SI-sYFP- β_2 -AR-CFP (Dorsch et al., 2009). SI bezeichnet dabei eine Signalsequenz, die zur Verbesserung der Membranlokalisation des Konstrukts eingefügt wurde. Zunächst wurde eYFP durch eine PCR mit den in Abschnitt 2.1.4 aufgeführten Primern aus dem Ausgangsvektor GRK2-YFP amplifiziert und mit der Signalsequenz versehen. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit BamHI und XbaI verdaut und durch einen Fluorophor-Austausch aus dem vorhandenen Konstrukt SI-sYFP- β_2 das Konstrukt SI-eYFP- β_2 erzeugt. Dieses Zwischenkonstrukt wurde dann über HindIII und HpaI in die Vektoren von β_2 -mTurq, β_2 -Cer und β_2 -CFP inkloniert.

2.1.4 Primer

Die zur Klonierung verwendeten Primer wurden bei Eurofins MWG (Ebersberg) bestellt (Tabelle 6). Zur Durchführung von Mutagenesen wurden HPLC-gereinigte Primer eingesetzt.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primer

Klonierung	Primersequenz
GRK2 (K220R)	5'-CAAGATGTACGCCATGAGGTGCCTGGACAAAAAG-3' 5'-CTTTTGTCCAGGCACCTCATGGCGTACATCTTG-3'
GRK2 (D110A)	5'-CCGGGAGATCTTCGCCTCATAATCATG-3' 5'-CATGATGTATGAGGCGAAGATCTCCCGG-3'
G α_q (P185K)	5'-GACGTGCTTAGAGTTCGAGTCAAGACTACAGGGATCATC GAATAC-3' 5'-GTATTCGATGATCCCTGTAGTCTTGACTCGAACTCTAAGC ACGTC-3'
SI-EYFP	5'-AAAAA ^{Aggatcc} ATGAAGACGATCATGCCCTGAGCTACATC TTCTGCCTGGTATTCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (BamHI) * 5'-AAAAA ^{Atctaga} CTTGTACAGCTCGTCC-3' (XbaI) * Signalsequenz (SI)

2.1.5 Bakterien

Verwendet wurden *Escherichia coli*-Bakterien vom Stamm DH5 α .

2.1.6 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden in HEK293T-Zellen („human embryonic kidney cells“) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine adhärent wachsende Zelllinie, die durch Transformation einer humanen embryonalen Nierenepithelzelle mit DNA-Sequenzen des menschlichen Adenovirus 5 erzeugt wurde. Zusätzlich exprimieren diese Zellen das SV40 large T-Antigen, das die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem SV40-Origin ermöglicht.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch eine PCR wird die Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts ermöglicht. Als Template wird Plasmid-DNA verwendet. Der zu amplifizierende Bereich wird durch zwei Primer bestimmt, die komplementär zum 5', die den benötigten DNA-Abschnitt enthielt. Dann wurden ein Forward- und eine Reverse-Primer entworfen, die komplementär zum Beginn bzw. Ende des DNA-Abschnitts waren und den zu amplifizierenden Bereich dadurch bestimmten. Ein typischer PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

2,5 µl	Template (1:1000)
1 µl	Forward-Primer (1:10)
1 µl	Reverse-Primer (1:10)
1 µl	dNTP-Mix
0,5 µl	KAPAHifi DNA-Polymerase
5 µl	KAPAHifi GC-Puffer 5x
ad 20 µl	Reinstwasser

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und die PCR anschließend in einem Thermocycler nach einem Schema vergleichbar dem folgenden durchgeführt:

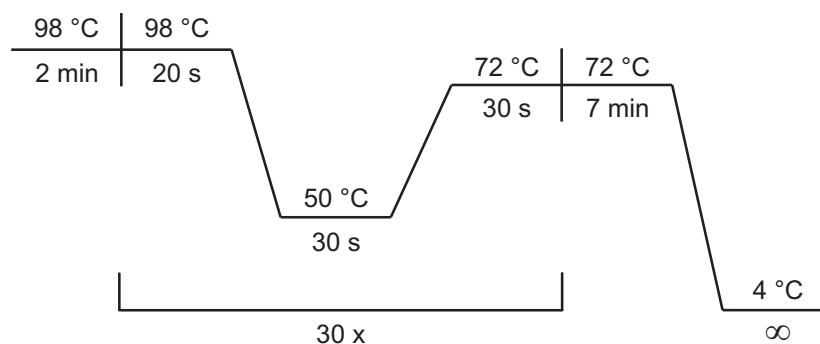


Abbildung 7: Beispielhafter Ablauf einer PCR

Der erste Schritt ist die Denaturierung bei 98 °C. In diesem Schritt werden die beiden DNA-Stränge des Templates aufgetrennt. Anschließend wird die Temperatur gesenkt, um die

Anlagerung der Primer an die Template-DNA zu ermöglichen (Annealing). Die Annealingtemperatur hängt von der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer ab und wird üblicherweise etwa 10 °C unterhalb der Schmelztemperatur gewählt. Im anschließenden Elongationsschritt wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase erhöht, welches im Fall der Phusion oder KAPAHifi bei 72 °C liegt. In diesem Schritt werden der Primer verlängert, so dass wieder doppelsträngige DNA entsteht. Die Dauer der Elongation hängt von der Geschwindigkeit der eingesetzten Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ab. Anschließend wird der Zyklus mit dem Denaturierungsschritt erneut begonnen. Insgesamt werden 30 Zyklen durchgeführt. Nach einem finalen Elongationsschritt wird die Temperatur auf 4 °C abgesenkt, um die Aktivität der DNA-Polymerase zu senken. Theoretisch wird der DNA-Strang in jedem Zyklus verdoppelt, praktisch nimmt die Amplifikation allerdings mit zunehmender Zyklusanzahl ab, weil die Konzentration an Primern sinkt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.10) aufgereinigt.

2.2.1.2 Mutagenese

Mutagenesen wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um einzelne Aminosäuren in der Gensequenz verwendeter Proteine auszutauschen. Sie wurden in Anlehnung an das Protokoll der Quick Change Mutagenese von Stratagene durchgeführt. Dazu wurden ein „Forward“ und ein „Reverse“ Primer mit einer Länge von je etwa 30 Basen entworfen, die komplementär zur Sequenz des Ausgangsplasmids waren, in der Mitte allerdings die gewünschte Mutation enthielten. Mittels PCR wurde die gewünschte Mutation auf das Plasmid übertragen. Die PCR wurde nach einem Schema ähnlich dem folgenden durchgeführt:

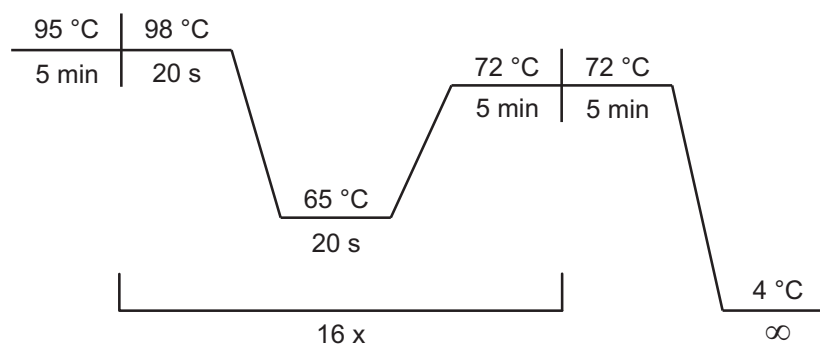


Abbildung 8: Beispielhafter Ablauf einer Mutagenese

Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz mit DpnI verdaut, einem Restriktionsenzym, das methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. In diesem Schritt wird das Ausgangsplasmid abgebaut, da es aus Bakterien gewonnen wurde und deshalb methyliert ist. Die während der PCR entstandenen DNA-Stränge mit der Mutation sind nicht methyliert, bleiben also erhalten. Das verdaute PCR-Produkt wurde in *Escherichia coli*-Bakterien (DH5 α) transformiert (Abschnitt 2.2.1.5), um den Plasmidring zu schließen und zu vervielfältigen.

2.2.1.3 Herstellung von LB-Medium und LB-Agar-Platten

Für die Kultur von *Escherichia coli*-Bakterien wurden LB-Medium als Nährmedium für die Suspensionskultur und LB-Agar-Platten als Festmedium eingesetzt. Zur Herstellung von LB-Medium wurde LB-Medium-Pulver nach Lennox (AppliChem) in der Konzentration 20 g/l in Reinstwasser gelöst, in Flaschen abgefüllt und autoklaviert. Zum Gießen von LB-Agar-Platten in Petrischalen wurde LB-Medium mit Zusatz von 1,5% Agar verwendet. Zur Verflüssigung wurde dieses in der Mikrowelle erwärmt und anschließend auf unter 50 °C abgekühlt, damit das benötigte Antibiotikum zugesetzt werden konnte. Häufig eingesetzt wurden hierbei Ampicillin Natriumsalz (100 mg/l) und Kanamycinsulfat (30 mg/l).

2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Bakterien

Da *Escherichia coli* (*E. coli*) unter normalen Bedingungen nur in geringem Maße Plasmid-DNA aus dem Medium aufnehmen, wurden zur Durchführung von Transformationen kompetente Bakterien verwendet. Zur Herstellung kompetenter *E. coli* wurden die Bakterien auf antibiotikafreien LB-Agar-Platten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde von einer Kolonie über Nacht eine Vorkultur in 10 ml LB-Medium angesetzt. Mit 5-10 ml der Vorkultur werden 250 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0,3-0,6 vermehrt, bis sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Anschließend werden die Bakterien bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und in 25 ml gekühltem TSB („transformation and storage buffer“-Puffer (10% (m/V) PEG 3000, 5% (V/V) DMSO, 20 mM MgCl₂ in LB-Medium) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Stunden auf Eis werden die Bakterien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.5 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien

Eine Transformation bezeichnet das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien, das in diesem Fall mittels der modifizierten Hitzeschock-Methode durchgeführt wurde. Es wurden Plasmide mit Antibiotika-Resistenz verwendet, um die Bakterien, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben, zu selektionieren. Für einen typischen Transformationsansatz wurden 200 ng Plasmid-DNA, 20 µl KCM-Puffer 5x (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂) und 80 µl Reinstwasser zusammenpipettiert und 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* hinzugefügt. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 50 min bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (Eppendorf, 600 rpm) inkubiert. 60 µl des Ansatzes wurden dann auf eine antibiotikahaltige Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur Bakterien, die mit dem Plasmid die entsprechende Antibiotikaresistenz aufgenommen hatten, überlebten und konnten eine Kolonie bilden.

2.2.1.6 DNA-Präparation (Midi)

Eine DNA-Präparation wurde zur Amplifikation eines Plasmids durchgeführt. Dazu wurden die transformierten *E. coli* vermehrt und anschließend die Plasmid-DNA aus den Bakterien gewonnen. Die Midi-Präparation wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits und den mitgelieferten Puffern durchgeführt. 100 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten, wurde das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler vermehrt und anschließend bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Die in diesem Schritt zugesetzte RNase A verhinderte eine Kontamination der Plasmid-DNA mit RNA. Es folgte die alkalische Lyse durch Zusatz von 4 ml Puffer P2. Das enthaltene Natriumdodecylsulfat lysiert die Zellmembran der Bakterien und durch das alkalische Milieu kommt es zur Denaturierung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA. Bei der anschließenden Neutralisierung mit 4 ml Puffer P3 kommt es zur Renaturierung der Plasmid-DNA, während die chromosomale DNA aufgrund ihrer Länge präzipitiert. Weitere Bestandteile des Präzipitats sind schwerlösliches Kaliumdodecylsulfat, Proteine und Zellmembranbruchstücke. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurde das Präzipitat bei 5000 rpm und 4 °C für 30 min abzentrifugiert, während die Plasmid-DNA im Überstand blieb. Der Überstand wurde auf eine

Anionenaustauschersäule gegeben, die zuvor mit 4 ml Puffer QBT equilibriert wurde, und zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die negativ geladene Plasmid-DNA bindet an die schwach basischen Gruppen der Säule und verbliebene Verunreinigungen wie Proteine, Polysaccharide und RNA-Fragmente können entfernt werden. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF in ein Kulturröhrchen mit 3,5 ml Isopropanol eluiert. Die in Isopropanol unlösliche Plasmid-DNA wurde bei 5000 rpm und 4 °C für 60 min pelletiert, mit 2 ml Ethanol 70% gewaschen, um Salze zu entfernen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 100 µl autoklavierten Reinstwasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.7 DNA-Präparation (Mini)

Eine Mini-Präparation erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie eine Midi-Präparation, allerdings in kleinerem Maßstab. Da keine Säulenaufreinigung stattfindet, ist die gewonnene Plasmid-DNA stärker verunreinigt und wurde daher ausschließlich für Kontrollverdaus im Laufe von Klonierungen verwendet. Für Sequenzierungen oder zur Transfektion in HEK293T-Zellen wurde Plasmid-DNA aus einer Midi-Präparation verwendet.

4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit einer Kolonie der transformierten *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler wachsen gelassen. 1,5 ml der Bakterien-Suspension wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 13300 rpm und 4 °C für 30 s abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Lösung 1 nach Zusatz von 2 µl RNase A (10 mg/ml) resuspendiert (Tabelle 7). Die Suspension wurde anschließend durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 alkalisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Neutralisation mit 150 µl Lösung 3 und Inkubation für 5 min auf Eis wurde das Präzipitat bei 13300 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorfgefäß mit 450 µl Isopropanol überführt. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-DNA bei 13300 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 450 µl Ethanol 70% bei 13300 rpm und 4 °C für 15 min gewaschen, getrocknet und in 50 µl autoklavierten Reinstwasser gelöst.

Tabelle 7: Lösungen zur Durchführung einer DNA-Präparation (Mini)

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris(base) in Reinstwasser pH 8,0	0,2 M NaOH 1% SDS in Reinstwasser	60 ml Kaliumacetat (5 M) 11,5 ml konz. Essigsäure 96% 28,5 ml Reinstwasser

2.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Nano-Photometers bestimmt, das die optische Dichte der Probe bei 260 nm misst. Alle Plasmide wurden mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

2.2.1.9 Restriktionsverdau

Zur Durchführung von Klonierungen oder zur Erfolgskontrolle kann die Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen verdaut werden, die in den meisten Fällen spezifische palindromische Sequenzmotive von vier bis acht Basenpaaren erkennen und an einer bestimmten Stelle innerhalb dieser Sequenz schneiden. Restriktionsenzyme wurden ursprünglich aus verschiedenen Bakterienstämmen isoliert und nach dem jeweiligen Stamm benannt. Bei den meisten Enzymen ist ein Verdau bei 37 °C für 1 Stunde ausreichend. Ein typischer Ansatz eines Restriktionsverdaus sah wie folgt aus:

2 µg	Plasmid-DNA
0,5 µl	pro Enzym
2 µl	geeigneter Puffer (10x)
0,2 µl	BSA (100x), wenn benötigt
ad 20 µl	Reinstwasser

2.2.1.10 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung der im Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde üblicherweise mit 1% Agarose in TAE-Puffer gegossen. Dem noch flüssigen Gel wurden 1-2 µl Ethidiumbromid zugegeben, um eine Detektion der DNA-Fragmente zu ermöglichen. Die aufzutrennenden Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und jeweils in eine Tasche des Gels pipettiert. Der Ladepuffer vereinfacht einerseits das Beladen des Gels, da durch das enthaltene Glycerol die Dichte der Probe erhöht wird, andererseits kann durch den zugesetzten Farbstoff die Laufstrecke der Probe verfolgt werden. In eine Tasche des Gels wurde zusätzlich eine DNA-Leiter mit Fragmenten bekannter Größe aufgetragen, um die Größe der DNA-Fragmente der Proben abschätzen zu können. In einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer wurde das Gel bei 80 V laufen gelassen, bis die Farbstoffbande das Ende des Gels erreichte. Während der Elektrophorese bewegten sich die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung Anode. Weil kleinere DNA-Fragmente schneller durch die Gelstruktur laufen als größere, erfolgte eine Größenauftrennung der Fragmente. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte anschließend auf dem UV-Tisch. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, was zu einer Verschiebung seines Absorptionsspektrums führt und die DNA-Banden sichtbar macht. Je nach Anwendung erfolgte nur eine Größenkontrolle der DNA-Fragmente oder die Bereiche mit den benötigten DNA-Fragmenten wurden ausgeschnitten, um die DNA weiter zu verarbeiten.

Tabelle 8: Lösungen zur Durchführung einer Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	Ladepuffer
40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA in Reinstwasser pH 8,0	40% Glycerol 10 mM EDTA 10 mM Tris 0,25% Orange G in Reinstwasser

2.2.1.11 Gelaufreinigung

Um DNA-Fragmente nach einer Agarosegelelektrophorese für eine Klonierung weiterzuverwenden, musste die DNA zunächst aus dem Gelstück eluiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kits. Dazu wurde das Gelstück bei 50 °C für 10 min auf dem Schüttelinkubator in 600 µl Puffer QG gelöst und 200 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Lösung wurde auf eine Trennsäule pipettiert und bei 13300 rpm für 1 min zentrifugiert, um die Lösung über die Säule zu bringen. Die DNA-Fragmente banden an die Säule und wurden mit 750 µl Waschpuffer PE bei 13300 rpm für 1 min gewaschen. Um verbliebenes Ethanol zu entfernen, wurde die Säule nach Entfernen des Eluates erneut für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden 30 µl Reinstwasser mittig auf die Säule pipettiert, für 1 min inkubiert und die DNA bei 13300 rpm für 1 min in ein neues Eppendorfgefäß eluiert.

2.2.1.12 Ligation

DNA-Fragmente, die mit Restriktionsenzymen verdaut wurden, können entweder glatte Enden oder einen Überhang aufweisen. Durch das Enzym Ligase können diese Enden in einer Ligation wieder verbunden werden. Dabei ist es vorteilhaft, wenn das Fragment N- und C-terminal nicht kompatible Schnittstellen aufweist. Dies sorgt dafür, dass das Fragment nur in einer Richtung in den Vektor eingebaut werden kann. Für Ligationen wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. Das Insert wurde dabei in 3-5-fachem molarem Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Ein typischer Ligations-Ansatz sah wie folgt aus:

1 µl	T4 DNA-Ligase
1 µl	T4 DNA-Ligasepuffer 10x
1 µl	Vektor
3 µl	Insert
ad 10 µl	Reinstwasser

Zusätzlich wurde eine Religationskontrolle pipettiert, bei der anstelle des Inserts die gleiche Menge Reinstwasser eingesetzt wurde. Diese diente zur Abschätzung, wie oft der geschnittene Vektor religierte, ohne das Insert einzufügen. Ligations- und Religations-Ansatz wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 µl der Ansätze in kompetente *E. coli* transformiert. Je weniger Kolonien auf der Religationsplatte gewachsen

waren, desto größer war die Wahrscheinlichkeit, dass ein Klon auf der Ligationsplatte das Insert enthielt.

2.2.1.13 Sequenzierung

Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurden durch Eurofins MWG durchgeführt. Dazu wurden DNA-Proben von 1 µg Plasmid-DNA in 15 µl Reinstwasser vorbereitet. Die Sequenzierung konnte entweder mit Standard-Primern, wie T7 oder pcDNAfw, durchgeführt werden oder mit eigenen Primern, die dann der Probe zugefügt wurden. Die Sequenzierung erfolgte nach der „Cycle-Sequencing“-Methode und konnte ca. 900 Basenpaare identifizieren. Bei dieser Methode wird eine PCR mit dem entsprechenden Primer durchgeführt, der neben normalen dNTPs auch Dideoxy-Nukleotide zugefügt sind, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die DNA-Verlängerung erfolgt solange, bis zufällig ein Dideoxy-Nukleotid eingebaut wird und die Amplifikation abbricht. Dadurch entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die am Ende jeweils fluoreszenzmarkiert sind. In einem 96-Kapillarsequenzierer werden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden in einem Detektionsfenster durch einen Laser angeregt, die Fluoreszenzsignale detektiert und mit Hilfe einer Analysesoftware in die Sequenz übersetzt.

2.2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.2.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden in HEK293T-Zellen („human embryonic kidney cells“) in einem Zellkulturlabor mit sterilen Materialien unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die HEK293T-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bei 37 °C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's MEM (4,5 g/l D-Glucose), angereichert mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin verwendet. Bei einer Konfluenz von 70% -80% wurden die Zellen in eine neue Zellkulturschale überführt. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Hilfe von 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium wurde die Trypsinierung abgestoppt und die Zellen durch mehrfaches hoch und runter pipettieren des Mediums suspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Der benötigte Anteil der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturschale überführt und mit Zellkulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Das Splitten der HEK293T-Zellen erfolgte im Abstand von einem bis drei Tagen.

2.2.2.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen, wobei die DNA nicht in das Genom der Zellen integriert wird und deshalb nach etwa 48 Stunden wieder aus den Zellen entfernt wird. Acht Stunden nach dem Ausplattieren der HEK293T-Zellen in 6 cm Zellkulturschalen erfolgte die transiente Transfektion der Zellen mit dem Qiagen Effectene Transfection Reagent. Bei dieser Methode wird die zu transfizierende DNA zunächst mit Hilfe des Enhancers kondensiert. Anschließend wird eine nicht-liposomale Lipidformulierung hinzugegeben, die die DNA mit kationischen Lipiden umschließt und so die Aufnahme der DNA in die Zellen ermöglicht. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Transfektionen wurden 150 µl Puffer, 20 µl Enhancer und 20 µl Effectene eingesetzt. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium in den Transfektionsschalen (Konfluenz 40-50%) gewechselt, dann das Transfektionsgemisch tropfenweise zugeben und durch vorsichtiges Bewegen der Schale verteilt. Nach 16 Stunden wurde erneut ein Medienwechsel durchgeführt, um die Transfektion zu stoppen.

Der in dieser Arbeit üblicherweise verwendete Transfektions-Ansatz bestand aus:

0,5 µg M₃-AChR; 1,6 µg Gα_q; 0,5 µg Gβ₁; 0,2 µg Gγ₂; 0,5 µg GRK2/GRK2-Mutanten/pcDNA3

Wo dies im Ergebnisteil beschrieben ist, wurde die Transfektion folgendermaßen variiert:

1 µg M₃-AChR; 1,6 µg Gα_q; 0,5 µg Gβ₁; 0,2 µg Gγ₂; 0,1 µg GRK2/GRK2-Mutanten/pcDNA3

2.2.2.3 Ausplattieren auf Deckgläschen

Für die Durchführung der FRET-Experimente wurden die transfizierten HEK293T-Zellen auf Glasdeckgläschen (Stärke 0,13 - 0,16 mm, Durchmesser 25 mm) ausplattiert. Damit die Zellen sich an den Deckgläschen anheften könnten, wurden diese zunächst mit Polylysin beschichtet. Dazu wurde jeweils ein Tropfen Poly-L-lysinhydrobromid-Lösung auf die Deckgläschen aufgebracht. Nach einer halben Stunde Inkubationszeit wurde die Lösung wieder abgesaugt und die Deckgläschen mit PBS gewaschen. Das Aussäen der Zellen auf die Deckgläschen erfolgte in 6-Well Zellkulturplatten auf die gleiche Weise wie es unter 2.2.2.1 beschrieben wurde. Das Splittverhältnis wurde so gewählt, dass die Deckgläschen während der FRET-Experimente eine Konfluenz von etwa 20% aufwiesen, damit eine Messung von Einzelzellen möglich war.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Western-Blot

Um in transfizierten Zellen exprimierte Proteine nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden Western-Blots mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen auf die gleiche Weise wie zur Durchführung von FRET-Messungen transfiziert (Abschnitt 2.2.2.2). Als Negativkontrollen wurden zusätzlich untransfizierte Zellen und Zellen, bei denen das nachzuweisende Protein durch leeren Vektor ersetzt wurde, verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine große Menge des für das nachzuweisenden Protein codierenden Plasmids transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und die Zellen mit 0,5 ml kaltem Lysepuffer geerntet (Tabelle 9). Die Zellsuspension wurde anschließend für 30 s mit Hilfe eines Ultraturrax oder alternativ durch Sonifizierung für 2 s homogenisiert und abzentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden als Probe verwendet. Um sicherzustellen, dass von jeder Bedingung die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, wurde die Proteinkonzentration durch einen Bradford- oder BCA-Test nach Herstellerangaben bestimmt und die Proben durch Zusatz von Lysepuffer auf die gleiche Proteinmenge eingestellt. 20 µl der Proben wurden mit 5 µl Ladepuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Ein 1 mm starkes SDS-Polyacrylamid-Gel (10%ig) wurde mit den Proben sowie mit 10 µl Page Ruler als Marker beladen und für 30 min bei 60 V, anschließend bei 120 V laufen gelassen, bis die Farbstoffbande das Ende des Gels erreichte. Anschließend wurde das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurde zunächst Filterpapier mit Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde für 10 min in Methanol aktiviert und dann in Transferpuffer überführt. Zur Durchführung eines Semidry-Blots wurden zwei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Gel und zwei weitere Filterpapiere ohne Luftblasen einzuschließen in einer Semidry-Kammer geschichtet und bei 15V für eine Stunde geblottet. Zur Durchführung eines Wet-Blots wurde das „Sandwich“ aus Filterpapieren, Gel und PVDF-Membran in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer gepackt und bei 110mA für 4h geblottet. Nach Ende des Blots wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde mit Blockmilch blockiert. Anschließend wurde die benötigte Verdünnung des Erstantikörpers in Blockmilch hergestellt und die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, dreimal für 5 min mit

TBST gewaschen, anschließend für eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert und erneut dreimal für 15 min mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung inkubiert und entwickelt. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Dazu wurde der Blot „gestrippt“, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde für 5 min mit TBST gewaschen, 15 min mit Strippingpuffer inkubiert, 5 min mit PBS und 5 min mit TBST gewaschen und eine Stunde mit Blockmilch blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit einem Primärantikörper gegen Aktin inkubiert und die weiteren Schritte wie oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle 9: Lösungen für die Durchführung von Western-Blots

Lysepuffer		Ladepuffer (5x)	
20 mM	Tris (pH 7,4	50%	Glycerin
50 mM	NaCl	312,5 mM	Tris-HCl
1 Tablette	Proteinase-Inhibitor (Roche, cOmplete ULTRA Tablets Mini EDTA-free)	10%	SDS
		25%	β-Mercaptoethanol
		0,1%	Bromphenolblau
ad 10 ml	Reinstwasser	ad 100 ml	Reinstwasser

Trenngel		Sammegel	
9,9 ml	Reinstwasser	5,5 ml	Reinstwasser
6,3 ml	1,5 M Tris pH 8,8	1,0 ml	0,5 M Tris pH 6,8
8,3 ml	Acryl/bis (30%)	1,3 ml	Acryl/bis (30%)
0,25 ml	10% SDS	0,08 ml	10% SDS
0,25 ml	10% APS	0,08 ml	10% APS
0,01 ml	TEMED	0,008 ml	TEMED

Laufpuffer (10x)		Transferpuffer (10x)	
144 g	Glycin	144 g	Glycin
30 g	TrisBase	30 g	TrisBase
10 g	SDS	ad 1 l	Reinstwasser
ad 1 l	Reinstwasser		pH 8,3

Transferpuffer (1x)		Blockmilch (5%)	
100 ml	Transferpuffer (10x)	25 g	Milchpulver
100 ml/200 ml	Methanol	ad 500 ml	TBST
ad 1 l	(Wet-/Semidry-Blot)		
	Reinstwasser		

10x TBS		TBST	
292 g	NaCl	100 ml	10x TBS
24,2 g	TrisBase	500 µl	Tween
ad 1 l	Reinstwasser	ad 1 l	Reinstwasser
	pH 7,5		

PBS (10x)		Strippingpuffer	
10,54 g	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	15 g	Glycin
180 g	NaCl	1 g	SDS
2,88 g	KH ₂ PO ₄	10 ml	Tween 20
ad 2 l	Reinstwasser	ad 1 l	Reinstwasser
			pH 2,2

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Methoden

Während fluoreszenzmikroskopischer Experimente mit lebenden HEK293T-Zellen wurden diese in physiologischer Salzlösung gehalten, die nachfolgend als Tyrode bezeichnet wird.

Tyrode (pH 7,3)	
137 mM	NaCl
5,4 mM	KCl
10 mM	HEPES
2 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂

2.2.4.1 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer

40-48 Stunden nach der transienten Transfektion der HEK293T-Zellen wurden FRET-Experimente an lebenden Einzelzellen durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch eine Versuchsanzahl von $n \geq 10$ aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen bestätigt. Eine allgemeine Beschreibung des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers befindet sich in der Einleitung.

2.2.4.1.1 Fluoreszenzmikroskop

Zur Durchführung der Experimente wurde ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Nikon, eclipse Ti) mit 100x Ölimmersionsobjektiv (Nikon, Plan Apo VC 100X/1.40 Oil ∞ /0.17 Dic N2) verwendet. Die Anregung der Fluoreszenzproteine erfolgte mit einer 300 W Xenon-Gasentladungslampe (Sutter Instruments, Lambda DG-4) oder alternativ mit LEDs der Wellenlänge 425 nm und 500 nm (CoolLED, pE-2), die bei einer Lichtintensität von 2% verwendet wurden. Als Anregungsfilter wurden ET430/24x für die CFP-Anregung und ET500/20x für die YFP-Anregung verwendet (Chroma). Zwei verschiedene Filterwürfel wurden genutzt. Während der FRET-Experimente wurde ein Langpass-Strahlenteiler (Chroma T455LP) eingesetzt, der für Fluoreszenzlicht von CFP und YFP durchlässig ist. Zur direkten Anregung von YFP und bei der Auswahl von Zellen wurde ein Dualband-Strahlenteiler in Kombination mit einem CFP/YFP-Emissionsfilter eingesetzt (Chroma, 59017bs und 59017m). Der Strahlengang durch beide Filterwürfel ist in Abbildung 9 veranschaulicht.

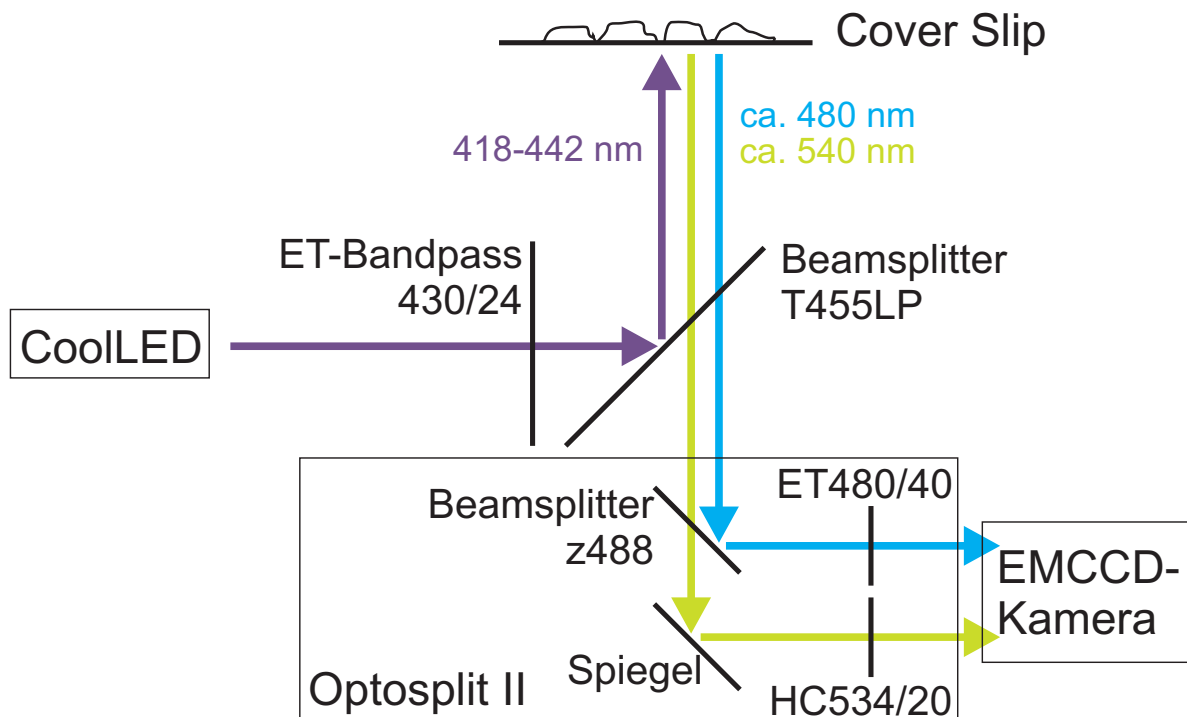
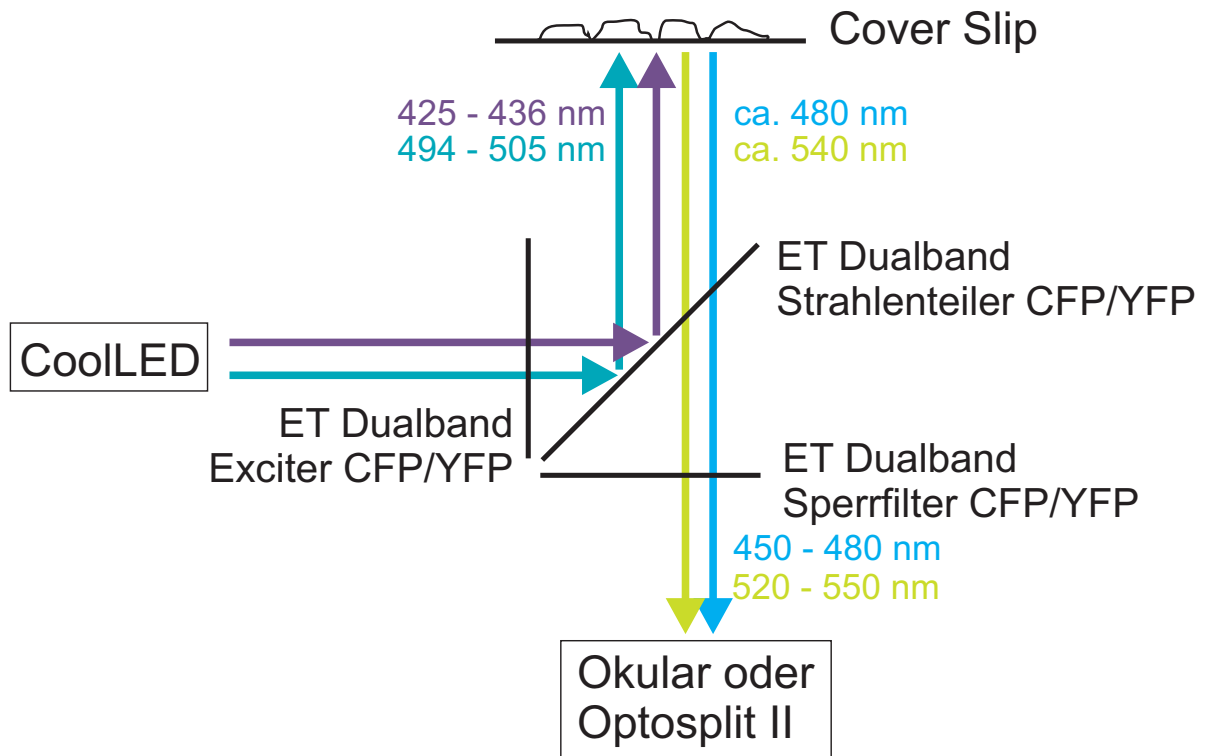
455LP-Filter:**CFP/YFP-Filter:**

Abbildung 9: Strahlengang durch 455LP- und CFP/YFP-Filter

Die CFP- und YFP-Fluoreszenz wurde anschließend im Optosplit II durch den dichroischen Spiegel z488/800-1064rpc (Chroma) aufgeteilt und durch ET480/40 (CFP) und HC534/20 (YFP) (Chroma) gefiltert. Die simultane Detektion der CFP- und YFP-Fluoreszenz erfolgte mit einer EMCCD-Kamera (Roper Scientific, Evolve 512). Dabei wurde der Kamerachip je zur Hälfte mit dem Bild des CFP- oder YFP-Kanals belichtet. Kamera und Lichtquelle wurden durch eine Trigger-Box (Nikon) synchronisiert. Alle Komponenten und die Aufnahme der Zeitserien wurden durch die Software NIS-Elements AR (Laboratory Imaging) gesteuert.

2.2.4.1.2 Durchführung der FRET-Experimente

Die auf Deckgläschen ausgeplattierten HEK293T-Zellen wurden nach Spülen mit Tyrode in eine Attofluor-Messkammer (Invitrogen) eingespannt und auf dem Objektisch befestigt. Über ein schnell schaltendes Perfusionssystem mit acht Kanälen (Ala Scientific Instruments, Ala-VC³-8SP) wurden die Zellen kontinuierlich mit Tyrode oder agonisthaltiger Tyrode überspült. In einem bestimmten Messintervall wurden die Zellen mit Licht einer Wellenlänge von 430 ± 12 nm bestrahlt, um CFP anzuregen, während gleichzeitig die Fluoreszenz von CFP und YFP in einem Messfeld um die Zelle und einem Messfeld im Hintergrund aufgezeichnet wurde. Das jeweils verwendete Messintervall ist im Ergebnisteil in der Bildunterschrift der Abbildungen beschrieben. Zur Korrektur der Falschanregung wurde YFP anschließend bei 500 ± 10 nm direkt angeregt und die YFP-Fluoreszenz aufgezeichnet.

2.2.4.1.3 Auswertung der Messdaten

Vor der Auswertung der Messdaten erfolgte eine Hintergrundkorrektur der aufgezeichneten Fluoreszenzintensitäten von CFP und YFP durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz zum entsprechenden Zeitpunkt. Die YFP-Fluoreszenz wurde zudem gegen Durchbluten und Falschanregung korrigiert (Abschnitt 2.2.4.1.4). Anschließend wurde das FRET-Ratio als $\frac{F_{YFP}}{F_{CFP}}$ berechnet. Wo dies in der Bildunterschrift der entsprechenden Abbildung beschrieben ist, wurden die Messdaten zudem durch Subtraktion einer linearen Ausgleichsgerade gegen kontinuierliches Bleichen korrigiert.

2.2.4.1.4 Korrektur von Durchbluten und Falschanregung

In Abbildung 10 sind die Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP dargestellt. Die gelbe Fläche markiert den Anteil der CFP-Fluoreszenz, der so langwellig ist, dass er im

YFP-Kanal detektiert wird. Dieser Effekt wird als Durchbluten bezeichnet und erhöht fälschlicherweise die gemessene Intensität in diesem Kanal. Das Ausmaß des Durchblutens ist abhängig von den verwendeten Filtern und wurde als prozentualer Anteil der CFP-Intensität von den gemessenen Werten des YFP-Kanals subtrahiert. Unter der Falschanregung versteht man, dass bei der zur Anregung von CFP verwendeten Wellenlänge (425 nm) auch ein gewisser Anteil YFP direkt angeregt wird (markiert durch die blaue Fläche in Abbildung 10). Das falsch angeregte YFP trägt zur YFP-Fluoreszenz bei und erhöht dadurch die gemessene YFP-Intensität. Das Ausmaß der Falschanregung ist vom YFP-Gehalt der Zelle abhängig. Zur Korrektur wurde dieser zunächst durch direkte Anregung von YFP bei 500 nm abgeschätzt und anschließend ein prozentualer Anteil der so ermittelten Intensität von der im Experiment registrierten und bereits gegen Durchbluten korrigierten YFP-Intensität subtrahiert.

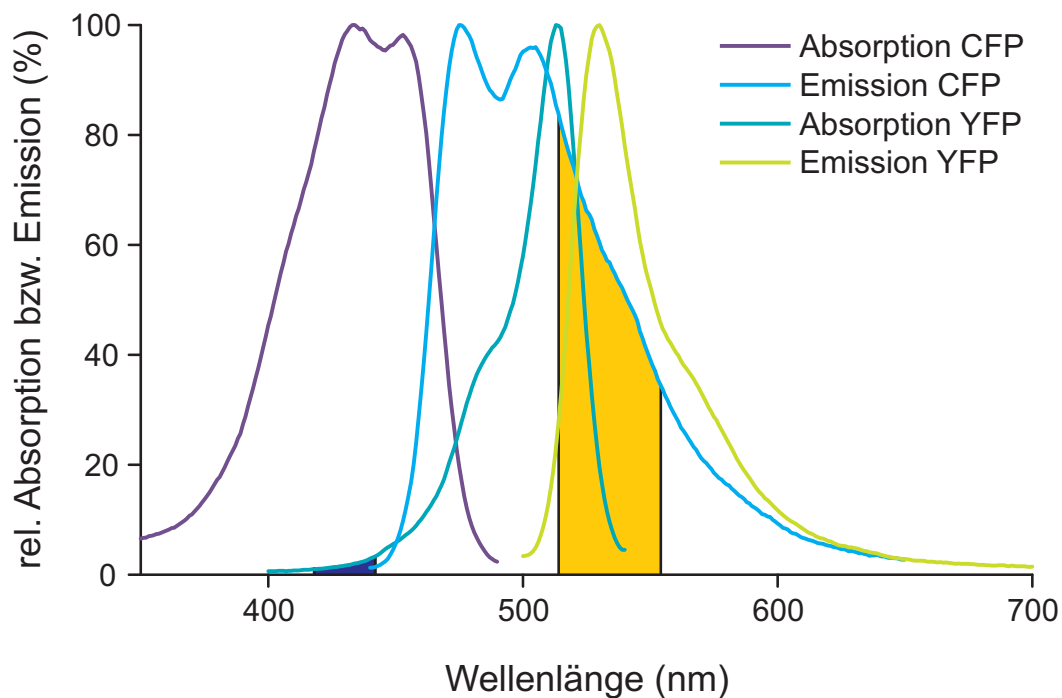


Abbildung 10: Absorptions- und Emissionsspektrum von CFP und YFP

Die gelbe Fläche markiert das Durchbluten der CFP-Fluoreszenz in den YFP-Kanal. Die blaue Fläche markiert die Falschanregung von YFP durch das CFP-Anregungslicht. Die Daten zu den CFP- und YFP-Spektren stammen vom „Fluorescence SpectraViewer“ (life technologies).

Welcher Prozentsatz für Durchbluten und Falschanregung jeweils angesetzt werden muss, ist von der Lichtquelle und den verwendeten Filtern abhängig und wurde deshalb regelmäßig als Korrekturfaktor bestimmt (Berney und Danuser, 2003).

Zur Bestimmung des Korrekturfaktors für das Durchbluten wurden Zellen verwendet, die ausschließlich mit einem CFP-markierten Plasmid transfiziert worden waren. Die Zellen wurden bei 425 nm (455LP-Filter) angeregt und die Fluoreszenz im CFP- und YFP-Kanal gemessen. Beide Intensitäten wurden hintergrundkorrigiert und der Korrekturfaktor als $\frac{F_{YFP-Kanal}}{F_{CFP-Kanal}}$ bestimmt. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lag das Durchbluten bei etwa 40% (Korrekturfaktor $\approx 0,4$). Zur Bestimmung des Korrekturfaktors für die Falschanregung wurden mit einem YFP-markierten Plasmid transfizierte Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 425 nm (455LP-Filter) und bei 500 nm (CFP/YFP-Filter) angeregt. In beiden Fällen wurde die Intensität im YFP-Kanal gemessen. Die Werte wurden hintergrundkorrigiert und der Korrekturfaktor als $\frac{F_{YFP-Kanal(425\text{ nm})}}{F_{YFP-Kanal(500\text{ nm})}}$ bestimmt. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lag die Falschanregung bei etwa 5% (Korrekturfaktor $\approx 0,05$).

2.2.4.1.5 Auswertung der absoluten FRET-Änderung

Um das FRET-Signal zwischen verschiedenen Bedingungen zu vergleichen, wurde für jede einzelne Messung die absolute FRET-Änderung als Differenz zwischen dem mittleren FRET-Ratio der letzten zehn Zeitpunkte vor Stimulation mit dem Agonist und vor Auswaschen des Agonisten bestimmt (Abbildung 11). Die so erhaltenen Daten jeder Bedingung wurden für die statistische Auswertung mittels ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test herangezogen. Zur graphischen Darstellung der Daten wurden für jede Bedingung Mittelwertskurven aus n Einzelexperimenten erzeugt und mit Standardfehlern für den jeweiligen Zeitpunkt dargestellt.

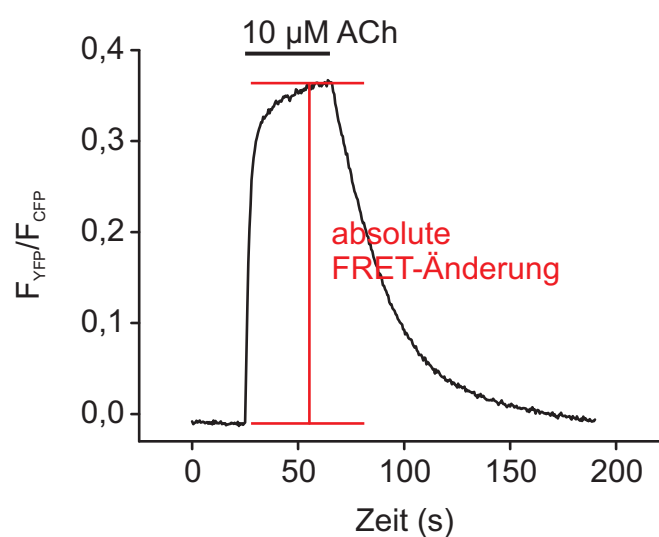


Abbildung 11: Auswertung der absoluten FRET-Änderung

2.2.4.1.6 Kinetische Auswertung der FRET-Änderung

Um die Kinetik der FRET-Änderung einzelner Bedingungen graphisch besser vergleichen zu können, wurde die absolute FRET-Änderung für jede einzelne Messung zwischen 0 und 1 normalisiert. Die Daten jeder Bedingung wurden gemittelt und als Mittelwertskurven aus n Einzelexperimenten mit Standardfehlern für den jeweiligen Zeitpunkt dargestellt. Die so erstellten Mittelwertskurven wurden zur Bestimmung einer biexponentiellen Kinetik über einen biexponentiellen Fit herangezogen. Im Fall einer monoexponentiellen Kinetik wurden die nicht normalisierten Einzelkurven über einen exponentiellen Fit ausgewertet (Abbildung 12). Die erhaltenen k -Werte wurden für die statistische Auswertung mittels ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test herangezogen.

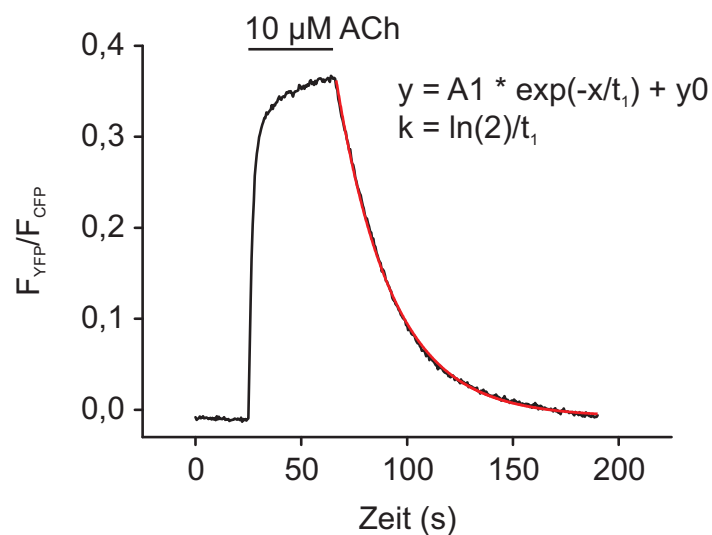


Abbildung 12: Kinetische Auswertung der FRET-Änderung

2.2.4.1.7 Auswertung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Zur Aufnahme von Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden Zellen mit steigenden Agonist-Konzentrationen stimuliert. Zwischen den Stimulationen wurde der Agonist solange ausgewaschen, bis das FRET-Ratio die Basislinie wieder erreicht hatte (Abbildung 13). Zur Auswertung wurde die absolute FRET-Änderung der einzelnen Konzentrationen auf die FRET-Änderung der sättigenden Agonist-Konzentration normalisiert. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve jeder einzelnen Messung wurde gefittet und der $\log(EC_{50})$ bestimmt. Mit diesen Daten erfolgte die statistische Auswertung mittels ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test. Zur graphischen Darstellung wurden für jede Bedingung zusätzlich die Mittelwerte für

die einzelnen Agonist-Konzentrationen berechnet und mit den jeweiligen Standardfehlern dargestellt. Durch diese gemittelten Werte wurde anschließend eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve gefittet.

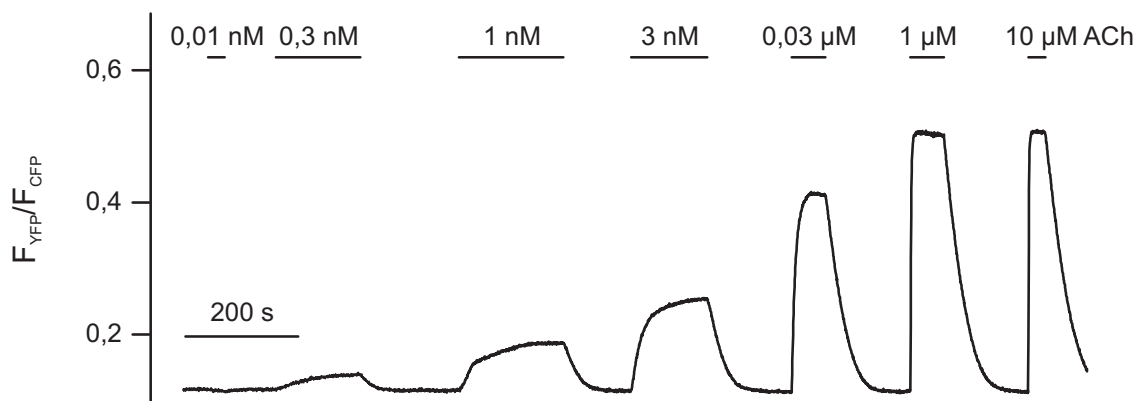


Abbildung 13: Beispielhafte FRET-Messung zur Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve

2.2.4.1.8 Berechnung des relativen Expressionslevels von CFP und YFP

Das relative Expressionslevel von CFP und YFP kann die Größe des FRET-Signals beeinflussen. Insbesondere wenn die Amplitude des FRET-Signals zwischen verschiedenen Bedingungen verglichen werden soll, ist es deshalb notwendig das relative Expressionslevel in den einzelnen Bedingungen zu bestimmen.

Um die Stöchiometrie der Expression von CFP und YFP für den jeweilige Versuch zu kalibrieren, wurde ein Referenzkonstrukt verwendet, das analog zum Konstrukt YFP- β_2 -AR-CFP (Dorsch et al., 2009) aufgebaut ist und beide Fluorophore in 1:1 Stöchiometrie trägt. Die enthaltenen Fluorophore müssen den Fluorophoren entsprechen, die im jeweiligen FRET-Versuch verwendet wurden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten FRET-Versuche wurden dementsprechend die Konstrukte SI-eYFP- β_2 -AR-mTurq, SI-eYFP- β_2 -AR-Cer und SI-eYFP- β_2 -AR-CFP kloniert. Die Fluorophore des Referenzkonstrukts wurden nacheinander direkt angeregt und die Fluoreszenz-Intensitäten aufgezeichnet. Nach Hintergrundkorrektur der Werte wurde der Quotient $\frac{F_{CFP}}{F_{YFP}}$ als Kalibrierfaktor berechnet.

Kalibrierfaktoren (Nikon, eclipse Ti):	SI-eYFP- β_2 -AR-mTurq	1,3487
	SI-eYFP- β_2 -AR-Cer	1,0302
	SI-eYFP- β_2 -AR-CFP	0,9430

Für jede einzelne FRET-Messung wurde der Quotient $\frac{F_{CFP}}{F_{YFP}}$ auf die gleiche Weise berechnet. Das Ergebnis wurde anschließend durch den Kalibrierfaktor dividiert, um das relative Expressionslevel zu bestimmen. Für eine Vergleichbarkeit des FRET-Signals verschiedener Bedingungen sollte sich das relative Expressionslevel nicht unterscheiden. Vorteilhaft ist ein Überschuss an FRET-Akzeptor YFP, weil unter dieser Bedingung keine Beeinflussung des FRET-Signals zu erwarten ist. Für jedes angeregte Donor-Molekül steht prinzipiell ein FRET-Partner zur Verfügung, so dass das gemessene FRET-Signal proportional zur FRET-Effizienz ist. Bei einem Überschuss an FRET-Donor steigt der Anteil an angeregten Donor-Molekülen, die keinen FRET-Partner besitzen. Eine Proportionalität zwischen FRET-Effizienz und gemessenem FRET-Signal ist nicht mehr gegeben, wodurch die Amplitude des FRET-Signals abnimmt.

2.2.4.2 Translokations-Experimente

Zur Untersuchung der Translokation von GRK2 an die Membran wurden in dieser Arbeit Experimente an zwei Konfokalmikroskopen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben sind.

2.2.4.2.1 Konfokalmikroskop (VisiTech)

Es wurde ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Olympus, IX 71) mit 100x Ölimmersionsobjektiv (Olympus, UPlanSApo 100x/ 1.40 Oil) verwendet, das mit einer konfokalen FRAP-Einheit (VisiTech international, VT-HAWK) ausgestattet ist. Als Strahlteiler wurde 405/ 491/ 642 DC (VisiTech international) verwendet. Zur Anregung von CFP und YFP wurde ein Laser-System (VisiTech international) mit Lasern der Wellenlänge 405 nm und 491 nm eingesetzt. In einem Optosplit II wurde die Fluoreszenz von CFP und YFP über den Strahlenteiler T495lpxr (Chroma) aufgespalten und durch die Filter ET470/40x und ET535/30m (Chroma) gefiltert. Das Fluoreszenzlicht wurde anschließend von einer CCD-Kamera (Hamamatsu, EM-CCD Digital Camera) detektiert. Zur Steuerung wurde die Software VoxCell Scan (VisiTech international) verwendet.

2.2.4.2.2 Konfokalmikroskop (Leica SP5)

Außerdem wurde zur Aufnahmen konfokalmikroskopischer Bilder ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SP5) mit 63x Ölimmersionsobjektiv (Lambda Blue 63x/1.4NA, oil) verwendet. Zur Anregung von CFP wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm, der Filter RT30/70 und PMT1 Leica/ECFP 415-485 nm eingesetzt.

2.2.4.2.3 Durchführung der Translokations-Experimente

Die Durchführung der Translokations-Experimente erfolgte vergleichbar zu den FRET-Experimenten. Die transfizierten HEK293T-Zellen wurden in einer Attofluor-Messkammer (Invitrogen) mit Tyrode auf dem Mikroskop eingespannt und über ein Perfusionssystem (Ala Scientific Instruments, Ala-VC³-8SP) kontinuierlich mit Tyrode oder agonisthaltiger-Tyrode überspült. Mit einer Frequenz von 2 Hz wurde GRK2-mTurq bei 405 nm angeregt und die Fluoreszenz von mTurq aufgezeichnet. Zur Bestimmung der relativen Expressionslevel wurde der YFP-markierte M₃-AChR anschließend bei 491 nm direkt angeregt und die YFP-Fluoreszenz aufgezeichnet.

2.2.4.2.4 Auswertung der Translokations-Experimente

Zur Auswertung der Translokations-Experimente wurde ein rechteckiger ROI im Zytoplasma der Zelle definiert und ein polygonaler ROI um die Membran der Zelle gelegt. Die mTurq-Intensität beider ROIs wurde anschließend für jeden Zeitpunkt ausgelesen und der Quotient $\frac{F_{\text{Membran}}}{F_{\text{Zytoplasma}}}$ berechnet. Die Berechnung des relativen Expressionslevels von CFP und YFP erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.1.8 beschrieben. Folgender Kalibrierfaktor wurde für das Konstrukt SI-eYFP-β₂-AR-mTurq ermittelt.

Kalibrierfaktor (Olympus, IX 71):	SI-eYFP-β ₂ -AR-mTurq	1,8123
-----------------------------------	----------------------------------	--------

2.2.5 Statistik und Software

Die Auswertung der Messdaten wurde mit Excel 2010 (Microsoft) und Origin Pro 9.1 (OriginLabs) durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden das arithmetische Mittel und der Standardfehler berechnet. ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test wurde zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Bedingungen verwendet. Zur Auswertung mikroskopischer Aufnahmen wurden ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, USA) eingesetzt. Für die Arbeit mit Plasmid-Sequenzen wurde ApE – A plasmid Editor 2.0.41 genutzt. Abbildungen von Kristallstrukturen wurden mit Hilfe von DeepView 4.1 (Guex und Peitsch, 1997, <http://www.expasy.org/spdbv/>) und Blender 2.62 (Blender Foundation, www.blender.org) erzeugt. CorelDraw X4 (Corel Corporation) wurde eingesetzt um alle Abbildungen in Publikationsqualität zu bringen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von $G\alpha_q$ auf die Rekrutierung der G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinase 2 (GRK2) zum M_3 -ACh-Rezeptor

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Effekten der Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und GRK2 auf die Rekrutierung dieser Kinase zum M_3 -ACh-Rezeptor und ihre Funktionalität. Durch Translokations-Experimente wurde der Einfluss von $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ auf die agonistabhängige Membrantranslokation der GRK2 untersucht. Die Interaktionen der GRK2 mit dem M_3 -ACh-Rezeptor sowie mit $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ wurden mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer analysiert. Darüber hinaus wurden die Sensitivität dieser Interaktionen und der Einfluss der $G\alpha_q$ -Bindung auf die Funktionalität der GRK2 über die Arrestinrekrutierung zum M_3 -ACh-Rezeptor untersucht.

3.1.1 Einfluss der G_q -Proteine auf die Translokation der GRK2

Um den Einfluss der G_q -Proteine auf die Translokation der GRK2 zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit unmarkiertem M_3 -ACh-Rezeptor und G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinase 2 (GRK2) transfiziert, die C-terminal mit mTurquoise markierte war (GRK2-mTurq). Die Funktionalität der markierten GRK2 war bereits bekannt (Brockmann, 2005). In einer Bedingung wurden zusätzlich die drei Untereinheiten des G-Proteins überexprimiert. Die Lokalisation der GRK2 in der Zelle wurde am Konfokalmikroskop im unstimulierten Zustand und nach Stimulation der M_3 -ACh-Rezeptoren mit 10 μ M Acetylcholin untersucht. Wie Abbildung 14 zeigt, war die GRK2 im unstimulierten Zustand überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Nach Stimulation mit 10 μ M ACh translozierte in der Bedingung mit überexprimierten G-Proteinen der Großteil der GRK2 an die Membran und nur ein kleiner Anteil verblieb im Zytoplasma. Fehlten die G-Proteine, blieb die GRK2 auch nach Stimulation des Rezeptors im Zytoplasma. Dieses Ergebnis bestätigte, dass aktivierte G-Proteine für die Translokation der GRK2 an die Membran erforderlich sind, was bereits beschrieben wurde (Pitcher et al., 1992). Es ist zu berücksichtigen, dass in der Bedingung ohne überexprimierte G-Proteine endogene G_q -Proteine vorhanden sind, die eine Translokation der GRK2 ermöglichen sollten. Dass dennoch keine Anreicherung der GRK2 an der Membran zu erkennen war, weist darauf hin, dass endogene G_q -Proteine im

vorliegenden stöchiometrischen Verhältnis nicht ausreichend waren, um eine deutliche Translokation der GRK2 zu bewirken.

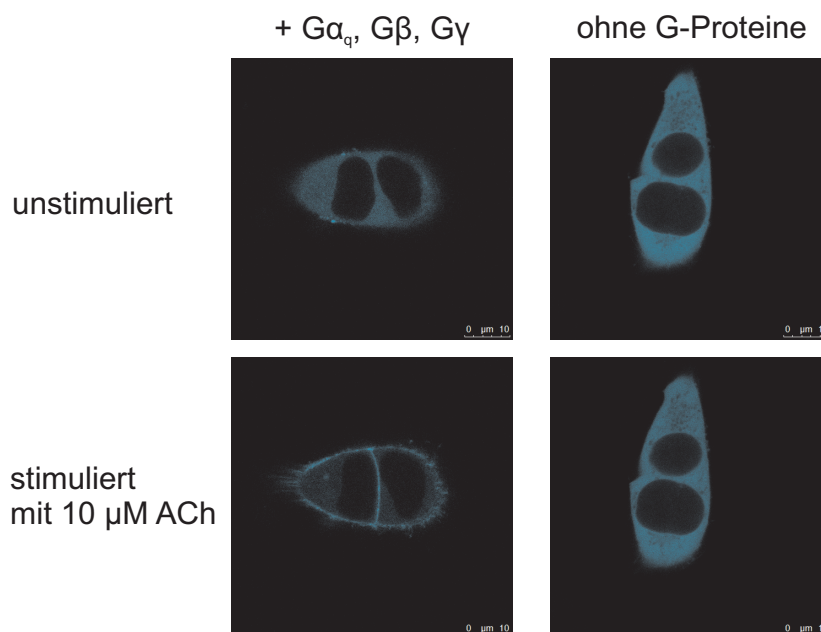


Abbildung 14: Membrantranslokation der GRK2 mit und ohne überexprimierte G-Proteine

HEK293T-Zellen wurden mit GRK2-mTurq, M₃-AChR und, wo angegeben, mit G_q-Protein transfiziert. Vor und nach Stimulation mit 10 μ M Acetylcholin wurden konfokale Aufnahmen nach Anregung von mTurq bei 405 nm gemacht (Leica SP5). Bei Überexpression des G_q-Proteins war eine deutliche Translokation der GRK2 zu erkennen.

3.1.1.1 G-Protein-bindereduzierte GRK2-Mutanten

Um den Einfluss der G_q-Protein-Untereinheiten auf die Translokation der GRK2 genauer zu untersuchen, wurden GRK2-Mutanten eingesetzt, deren Bindeaffinität zu G_q beziehungsweise G $\beta\gamma$ reduziert war. Zur Erzeugung dieser GRK2-Mutanten wurden bereits publizierte Punktmutationen in der Aminosäuresequenz der GRK2 eingeführt (Abbildung 15).

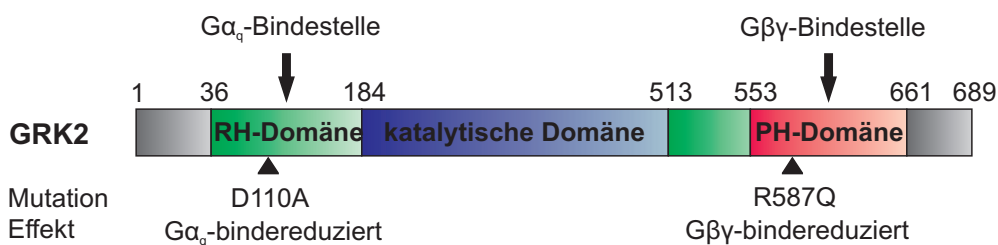


Abbildung 15: Schematische Darstellung der eingefügten Mutationen in der GRK2

Das Konstrukt GRK2 (R587Q) (Carman et al., 2000) weist eine erniedrigte Interaktion mit $G\beta\gamma$ auf und wurde von Dr. Cornelius Krasel kloniert. Das Konstrukt GRK2 (D110A) (Sterne-Marr et al., 2003) ist in der Bindung von $G\alpha_q$ beeinträchtigt. Zudem wurde die Doppelmutante GRK2 (D110A + R587Q) kloniert, deren Interaktion mit $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ reduziert war. Die Effektivität der beschriebenen Punktmutationen wurde in Abschnitt 3.1.4 durch FRET-Experimente zwischen den GRK2-Mutanten und den betroffenen G-Protein-Untereinheiten nachgewiesen. Des Weiteren wurde die dominant-negative GRK2-Mutante GRK2 (K220R) (Kong et al., 1994) erzeugt. Diese Mutante weist eine reduzierte Kinaseaktivität auf und wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Einfluss der Rezeptor-Phosphorylierung in den einzelnen Experimenten zu kontrollieren. Für die Durchführung der Experimente ist eine vergleichbare Expression der unterschiedlichen GRK2-Mutanten sehr wichtig. In dieser Arbeit wurden in erster Linie FRET-Experimente mit fluoreszenzmarkierter GRK2 in einzelnen Zellen durchgeführt. Aus diesem Grund konnte in jeder untersuchten Zelle das relative Expressionsverhältnis der FRET-Partner direkt bestimmt und zwischen den verschiedenen Bedingungen verglichen werden. Sofern die GRK2 nicht in fluoreszenzmarkierter Form vorlag, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, um eine vergleichbare Expression der unterschiedlichen GRK2-Mutanten sicherzustellen.

Zunächst wurde die agonistabhängige Translokation der GRK2-Mutanten an die Membran untersucht (Abbildung 16). Wie in Abbildung 14 wurden HEK293T-Zellen dazu mit M_3 -ACh-Rezeptor, G_q -Protein und der jeweiligen mTurquoise-markierten GRK2-Mutante transfiziert. GRK2 (K220R) und $G\alpha_q$ -binderreduzierte GRK2 (D110A) zeigten eine deutliche Membrantranslokation nach Stimulation mit 10 μ M ACh. Wie bereits beschrieben, ist die $G\beta\gamma$ -Bindung entscheidend an der Membranrekrutierung der GRK2 beteiligt (Pitcher et al., 1992). Da die $G\beta\gamma$ -Interaktion dieser beiden Mutanten nicht beeinträchtigt ist, war eine mit der Wildtyp-GRK2 vergleichbare Membrantranslokation zu erwarten (vgl. Abbildung 14). Doch auch die $G\beta\gamma$ -binderreduzierte GRK2 (R587Q) transloziert agonistabhängig an die Membran, im Gegensatz zur GRK2-Doppelmutante, die keine sichtbare Translokation zeigt. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass nicht nur die Bindung von $G\beta\gamma$ an der Rekrutierung der GRK2 an die Membran beteiligt ist, sondern dass auch $G\alpha_q$ alleine eine Translokation der GRK2 bewirken kann.

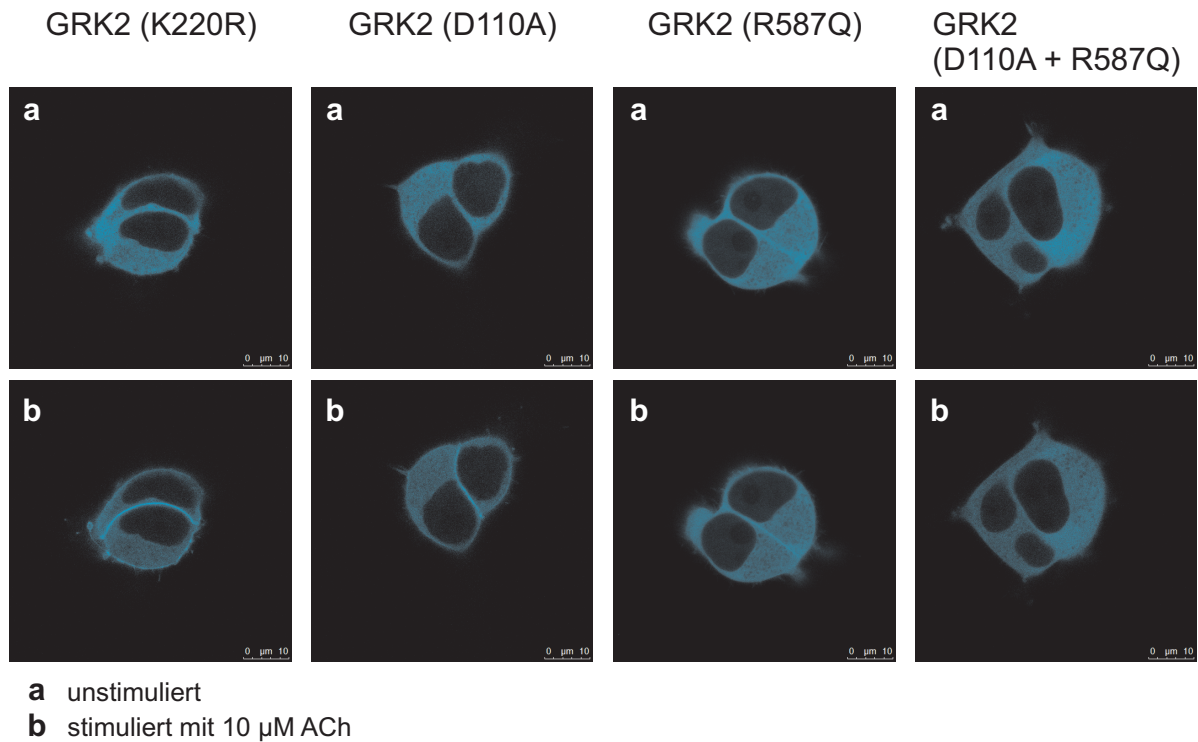


Abbildung 16: Membrantranslokation der unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen wurden mit den mTurq-markierten GRK2-Mutanten, M_3 -AChR und G_q -Protein transfiziert. Vor und nach Stimulation mit 10 μ M Acetylcholin wurden konfokale Aufnahmen nach Anregung von mTurq bei 405 nm aufgenommen (Leica SP5). Im Gegensatz zur Doppelmutante ist sowohl bei der $G\alpha_q$ -binderreduzierten (D110A) als auch bei der $G\beta\gamma$ -binderreduzierten (R587Q) GRK2-Mutante eine Translokation an die Membran erkennbar.

3.1.2 Agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zum M₃-ACh-Rezeptor

Im nächsten Schritt wurde die agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zum M₃-ACh-Rezeptor mit Hilfe von FRET-Experimenten untersucht. Die Experimente erfolgten in einzelnen lebenden HEK293T-Zellen mit hoher zeitlicher Auflösung. Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung der FRET-Experimente findet sich im Methodenteil (Abschnitt 1.4.2.1). Die Transfektion der HEK293T-Zellen erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei den zuvor beschriebenen Konfokalaufnahmen, mit Ausnahme des Rezeptors, der in YFP-markierter Form transfiziert wurde.

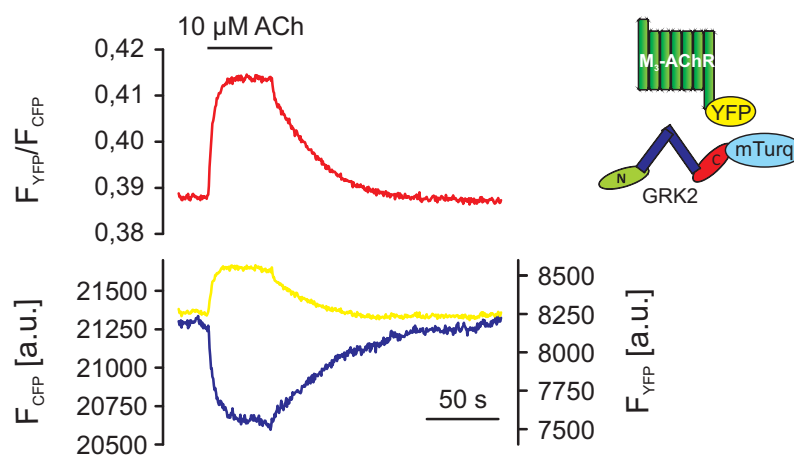


Abbildung 17: Repräsentative FRET-Messung zwischen M₃-AChR-YFP und GRK2-mTurq

HEK293T-Zellen wurden mit M₃-AChR-YFP, GRK2-mTurq und unmarkiertem Gα_q, Gβ₁ und Gγ₂ transfiziert. Während der FRET-Messung an lebenden Einzelzellen wurde mTurq mit einer Frequenz von 2 Hz bei 425 nm angeregt und die Fluoreszenz von mTurq und YFP simultan aufgezeichnet. Eine Stimulation des M₃-ACh-Rezeptors mit 10 µM Acetylcholin (dargestellt durch den schwarzen Balken) führte zu einer reversiblen Zunahme der YFP-Fluoreszenz (gelbe Kurve) und korrespondierend zu einer Abnahme der mTurq-Fluoreszenz (blaue Kurve), wodurch die Interaktion der GRK2 mit dem M₃-AChR widerspiegelt wird. Außerdem wurde das FRET-Ratio als $\frac{F_{YFP}}{F_{CFP}}$ berechnet (rote Kurve).

Während des FRET-Experiments wurde mTurquoise bei einer Wellenlänge von 425 nm angeregt und die Fluoreszenz von mTurquoise und YFP simultan aufgezeichnet. Die Zellen wurden dabei kontinuierlich mit Tyrode oder einer Agonist-Lösung überspült. Die Agonist-Zugabe wird in Abbildung 17 und den nachfolgenden Abbildungen durch eine waagerechte schwarze Linie gekennzeichnet. Wie Abbildung 17 zeigt, führte die Stimulation der M₃-ACh-Rezeptoren mit einer sättigenden Agonist-Konzentration von 10 µM Acetylcholin zu einer reversiblen Zunahme der YFP-Fluoreszenz (gelbe Kurve) und korrespondierend zu einer Abnahme der mTurquoise-Fluoreszenz (blaue Kurve). Dies spiegelt die reversible Interaktion

der GRK2 mit dem M₃-ACh-Rezeptor wider. Zusätzlich wurde das FRET-Signal ratiometrisch als $\frac{F_{YFP}}{F_{CFP}}$ berechnet und im Folgenden als FRET-Ratio bezeichnet. Im weiteren Verlauf wird in den meisten Fällen nur die Mittelwertkurve des FRET-Signals mehrerer Messungen dargestellt. Für jede einbezogene Einzelmessung wurde allerdings sichergestellt, dass YFP- und mTurquoise-Fluoreszenz einen gegenläufigen Verlauf zeigten.

Bei FRET-Experimenten besteht die Möglichkeit, dass ein FRET-Signal nicht durch eine direkte Interaktion der beiden markierten FRET-Partner ausgelöst wird, sondern dadurch, dass die beiden Fluorophore sich durch indirekte Ursachen annähern. Um dies auszuschließen, wurde die Spezifität des gemessenen FRET-Signals untersucht. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit dem gleichen Transfektionsansatz wie zuvor beschrieben, sowie zusätzlich mit unmarkierten α_{2A} -adrenergen Rezeptoren (α_{2A} -AR) und G α_{i1} -Proteinen transfiziert.

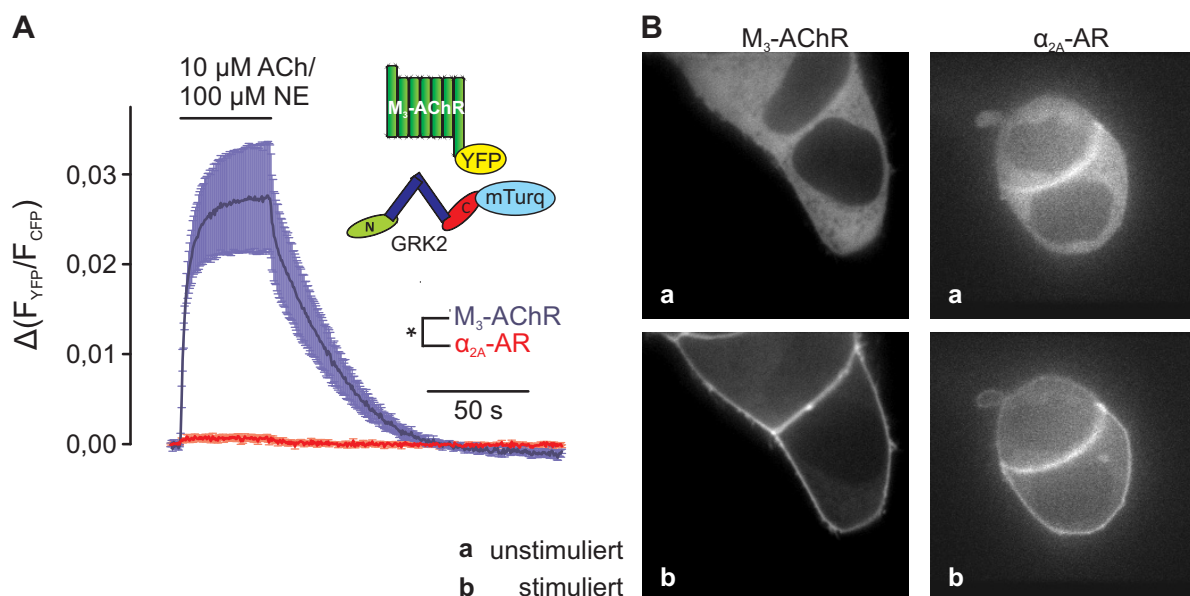


Abbildung 18: Bestätigung der Spezifität des FRET-Signals zwischen M₃-AChR-YFP und GRK2-mTurq

HEK293T-Zellen wurden mit M₃-AChR-YFP, GRK2-mTurq und unmarkiertem G α_q , G β_1 und G γ_2 (blaue Kurve) bzw. zusätzlich mit unmarkiertem α_{2A} -adrenergen Rezeptor und G α_{i1} (rote Kurve) transfiziert. (A) An lebenden Einzelzellen wurden FRET-Messungen bei einer Frequenz von 2 Hz durchgeführt. Die Zellen der ersten Bedingung wurden mit 10 μ M ACh stimuliert, während die Zellen der zweiten Bedingung zur Kontrolle der Spezifität des FRET-Signals mit 100 μ M Norepinephrin stimuliert wurden. Die Einzelmessungen wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; n \geq 5) und die absolute FRET-Änderung dargestellt. Die Rekrutierung der GRK2 zu den α_{2A} -adrenergen Rezeptoren führte nur zu einem unwesentlichen FRET-Anstieg, was eine hohe Spezifität des FRET-Signals zwischen GRK2 und den M₃-ACh-Rezeptoren bestätigte (*: p<0,05). (B) Konfokale Aufnahmen lebender Einzelzellen nach Anregung von mTurq bei 405 nm vor und nach Stimulation der Zellen mit 10 μ M ACh bzw. 100 μ M NE (fünf aufeinander folgenden Aufnahmen einer Zeitserie wurden gemittelt, VisiTech). Bei beiden Bedingungen ist eine deutliche agonistabhängige Translokation der GRK2 an die Membran erkennbar.

Die Stimulation der α_{2A} -AR-transfizierten Zellen mit 100 μ M Norepinephrin bewirkte eine Translokation der GRK2 an die Membran zu den α_{2A} -adrenergen Rezeptoren. Die Translokation der GRK2 an die Membran nach Stimulation der α_{2A} -AR konnte durch konfokalmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden (Abbildung 18B). Obwohl die GRK2 somit in relative Nähe zu den M_3 -ACh-Rezeptoren kommt, ist nur ein unwesentlicher Anstieg im FRET erkennbar (Abbildung 18A), was eine hohe Spezifität des FRET-Signals zwischen GRK2 und den M_3 -ACh-Rezeptoren bestätigt.

Um den Einfluss von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ auf die Interaktion zwischen GRK2 und M_3 -ACh-Rezeptor zu untersuchen, wurden anschließend die unterschiedlichen GRK2-Mutanten unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen untersucht (Abbildung 19).

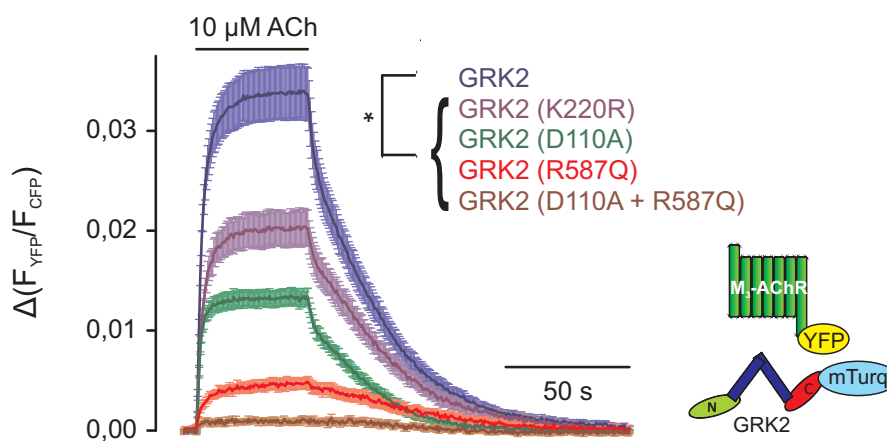


Abbildung 19: Amplitude des FRET-Signals zwischen M_3 -AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen transfiziert mit M_3 -AChR-YFP, den mTurquoise-markierten GRK2-Mutanten und unmarkiertem $G\alpha_q$, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 12$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M_3 -AChR mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$).

Im Vergleich zur Wildtyp-GRK2 zeigten GRK2 (R587Q) und GRK2 (D110A + R587Q) nur einen leichten agonistabhängigen Anstieg im FRET, wobei das FRET-Signal der Doppelmutante noch stärker reduziert war als das von GRK2 (R587Q). Da beide Mutanten eine reduzierte Bindeaffinität gegenüber $G\beta\gamma$ aufweisen, verdeutlicht dies wiederum die Bedeutung von $G\beta\gamma$ bei der GRK2-Rekrutierung.

Interessanterweise war auch das FRET-Signal der $G\alpha_q$ -binderreduzierten Mutante GRK2 (D110A) gegenüber Wildtyp-GRK2 signifikant reduziert, was darauf hinweist, dass auch $G\alpha_q$ an der Rekrutierung von GRK2 zum M_3 -ACh-Rezeptor beteiligt ist. Für eine effektive Translokation der GRK2 zum Rezeptor scheinen also $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ erforderlich zu sein. Da die Bindeaffinität der GRK2 (K220R) gegenüber $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ nicht verändert ist, sollte sich diese Mutante wie Wildtyp-GRK2 verhalten. Dass das FRET-Signal dieser Mutante allerdings auch signifikant reduziert war, war zunächst überraschend, konnte im späteren Verlauf dieser Arbeit aber aufgeklärt werden (Abschnitt 3.1.2.1).

Die „Onset“-Kinetik der FRET-Änderung jeder Bedingung wurde über einen monoexponentiellen Fit ausgewertet (Tabelle 10). Zwischen Wildtyp-GRK2, GRK2 (K220R) und GRK2 (D110A) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 20A, Tabelle 10). Für Wildtyp-GRK2 ergab sich im Mittel eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1,48$ s. Die „Onset“-Kinetik der $G\beta\gamma$ -binderreduzierten GRK2 (R587Q) war gegenüber den anderen GRK2-Mutanten mit $t_{1/2} = 2,49$ s allerdings signifikant verlangsamt. Im Unterschied zu den anderen GRK2-Mutanten erfolgte die Rekrutierung von GRK2 (R587Q) vorwiegend über $G\alpha_q$. Dies lässt also vermuten, dass die $G\alpha_q$ -vermittelte Translokation der GRK2 zum Rezeptor mit langsamerer Kinetik abläuft als die GRK2-Rekrutierung über $G\beta\gamma$.

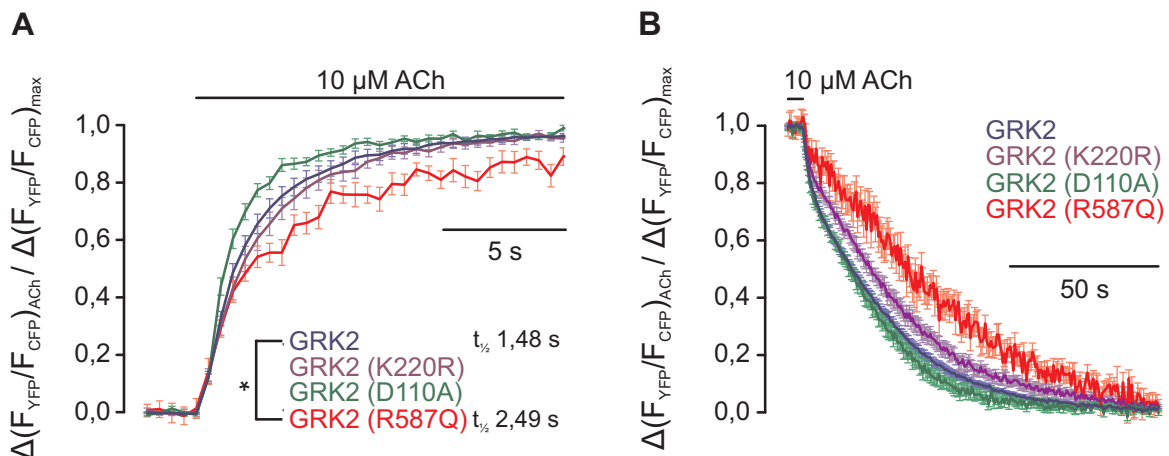


Abbildung 20: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M_3 -AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Varianten

Zum Vergleich der „Onset“- (A) und „Offset“-Kinetik (B) des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 19 dargestellten FRET-Experiments wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 16$). Die statistische Auswertung der „Onset“-Kinetik erfolgte über einen monoexponentiellen Fit jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). Die „Offset“-Kinetik wurde über einen biexponentiellen Fit der Mittelwertkurve ausgewertet.

Tabelle 10: Auswertung der „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen M₃-AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

Im Fall biexponentieller Kinetik sind erste und zweite Phase als (1) und (2) in Kombination mit dem jeweiligen Anteil der beiden Phasen an der Gesamtkinetik dargestellt.

	„Onset“-Kinetik		„Offset“-Kinetik		
	k (1/s) [MW ± S.E.M]	t _½ (s)	k (1/s)		t _½ (s)
GRK2	0,47 ± 0,04	1,48	(1) 0,5 (2) 0,02	3,1% 96,9%	1,4 34,1
GRK2 (K220R)	0,39 ± 0,04	1,76	(1) 0,6 (2) 0,02	0,09% 99,9%	1,2 46,1
GRK2 (D110A)	0,63 ± 0,05	1,09	(1) 0,5 (2) 0,02	0,5% 99,5%	1,4 44,5
GRK2 (R587Q)	0,28 ± 0,05	2,49	0,009		75,7

Auch die „Offset“-Kinetik des FRET-Signals nach Auswaschen des Agonisten wurde durch exponentiellen Fit bestimmt (Abbildung 20B). Im Gegensatz zur „Onset“-Kinetik ließ sich diese am besten durch eine biexponentielle Funktion beschreiben. Initial ist ein schneller Abfall des FRET-Ratios erkennbar, dem sich eine zweite Phase mit flacherem Verlauf anschließt. Die zweite Komponente macht dabei den Hauptteil der Dissoziations-Kinetik aus. Die Auswertung ergab für Wildtyp-GRK2 $t_{½}(1) = 1,4$ s und $t_{½}(2) = 34,1$ s. Verglichen mit anderen Dissoziations-Kinetiken, die im Folgenden noch beschrieben werden, ist die hier gemessene „Offset“-Kinetik sehr langsam, was auf eine stabile Interaktion zwischen GRK2 und M₃-ACh-Rezeptor hindeutet. Mögliche Gründe für die schnelle initiale Phase wären eine Konformationsänderung während der Rezeptordeaktivierung oder die Dissoziation einer GRK2-Population, die den Rezeptor mit niedrigerer Affinität gebunden hat. Auffällig war, dass die Gβγ-bindereduzierte GRK2-Mutante (R587Q) verzögert vom Rezeptor dissoziierte. Dies weist auf eine höhere Bindeaffinität zwischen Rezeptor und GRK2 (R587Q) im Vergleich zu den übrigen GRK2-Mutanten hin. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass die GRK2 in Abhängigkeit der Bindung von Gα_q und Gβγ in unterschiedlicher Konformation an den Rezeptor bindet.

3.1.2.1 Einflussfaktoren auf die Größe des FRET-Signals

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Amplitude eines im FRET-Experiment gemessenen Signals. Wenn, wie in dieser Arbeit, die Größe des FRET-Signals als Maß für die Interaktion zwischen zwei FRET-Partner herangezogen werden soll, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein, um die Vergleichbarkeit der Amplitude des FRET-Signal zwischen verschiedenen Bedingungen zu gewährleisten.

Wichtige Einflussfaktoren sind Abstand und Orientierung der beiden Fluorophore im gebildeten Komplex. Wenn in der Aminosäuresequenz eines der beiden FRET-Partner größere Änderungen vorgenommen werden, kann dies die Orientierung der Fluorophore zueinander so stark ändern, dass keine Vergleichbarkeit der resultierenden FRET-Signale mehr gegeben ist. Die in dieser Arbeit verwendeten GRK2-Mutanten wurden durch einzelne Punktmutationen erzeugt, so dass größere Auswirkungen auf die Struktur der GRK2 als unwahrscheinlich einzuschätzen sind. Ein weiterer Einflussfaktor ist das relative Expressionslevel von mTurquoise und YFP. Dabei ist wichtig, welches Fluorophor im Überschuss vorliegt. Ein Überschuss an FRET-Akzeptor (YFP) ist von Vorteil, da unter dieser Bedingung prinzipiell für jedes angeregte Donor-Molekül (mTurq) ein FRET-Partner zur Verfügung steht. Bei einem Überschuss an mTurquoise steigt der Anteil an angeregten Donor-Molekülen, die keinen FRET-Partner besitzen. Damit steigt die Donor-Fluoreszenz insgesamt an, was die Amplitude des FRET-Signals reduziert. Weiterhin ist wichtig, wie sich die eingeführten Punktmutationen auf die Expression der jeweiligen GRK2-Mutante auswirken. Das tatsächlich vorliegende Expressionsverhältnis in den zur Messung ausgewählten Zellen ist dabei entscheidender, als die durchschnittliche Expression, die man z.B. mittels Western-Blot bestimmen würde. Aus diesem Grund sollte das Expressionsverhältnis für jede einzelne Messung bestimmt werden. Dazu wurden mTurquoise und YFP nacheinander direkt angeregt und die jeweilige Fluoreszenzintensität gemessen. Zur Kalibrierung wurde ein Referenzplasmid eingesetzt, das beide Fluorophore in 1:1-Stöchiometrie enthielt. Die genaue Durchführung ist im Methodenteil beschrieben.

Die Auswertung der bisher gezeigten Experimente ergab einen 3-10-fachen Überschuss an mTurquoise-markierter GRK2 gegenüber M₃-AChR-YFP und signifikante Unterschiede im relativen Expressionslevel zwischen den Bedingungen (Abbildung 21). Besonders ausgeprägt war der Überschuss an mTurquoise bei GRK2 (D110A) und GRK2 (D110A + R587Q), so

dass das Ausmaß der Interaktion bei diesen Bedingungen wahrscheinlich deutlich unterschätzt wurde. Die „Onset“- und „Offset“-Kinetik der gemessenen FRET-Signale sollte allerdings durch die Unterschiede im relativen Expressionslevel nicht wesentlich beeinflusst sein.

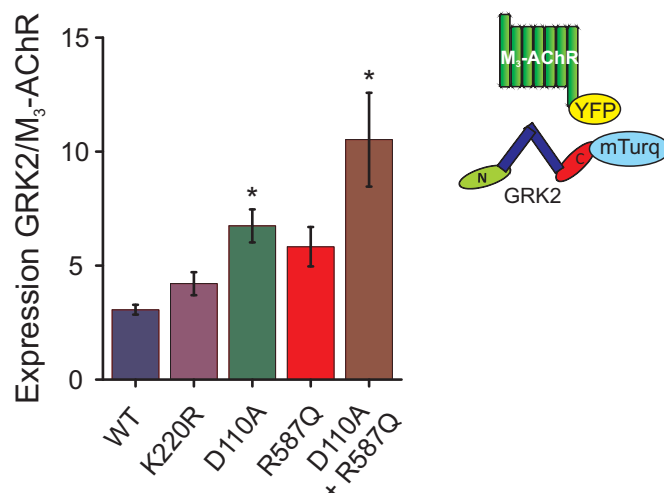


Abbildung 21: Relative Expressionslevel zwischen M₃-AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Varianten

Die Auswertung des relativen Expressionslevels der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 19 gezeigten FRET-Experiments ergab einen signifikant größeren Überschuss an GRK2 (D110A) und GRK2 (D110A + R587Q) verglichen mit den anderen Bedingungen (ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test, *: $p < 0,05$).

Um das Problem zu lösen, wurde das FRET-Experiment mit umgekehrt markierten FRET-Partnern wiederholt. Zudem wurden die transfizierten DNA-Mengen von GRK2-YFP und M₃-AChR-mTurquoise angepasst, bis das relative Expressionslevel der verschiedenen Bedingungen nicht mehr signifikant unterschiedlich war und ein Überschuss an YFP vorlag. Bei den so etablierten Versuchen war keine Beeinflussung des FRET-Signals durch das relative Expressionslevel zu erwarten und die resultierenden Amplituden konnten als Maß für die Interaktion zwischen beiden FRET-Partnern verwendet werden (Abbildung 22).

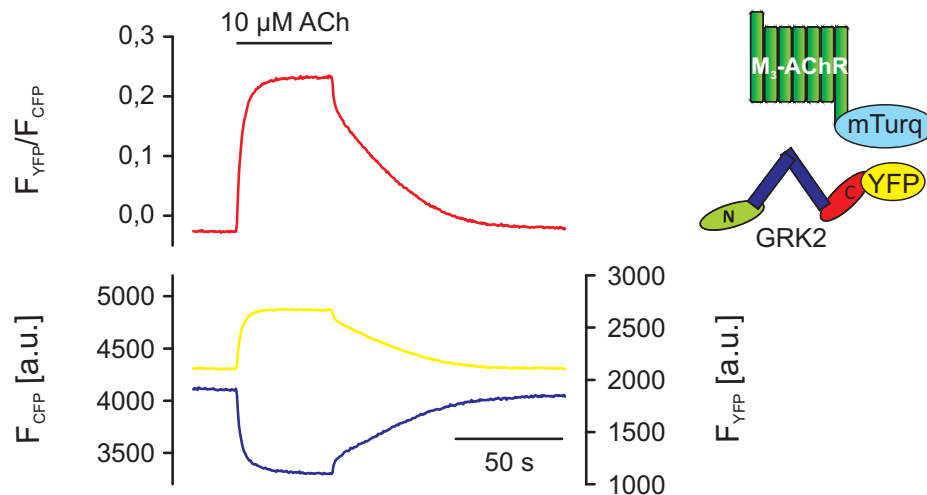


Abbildung 22: Repräsentative FRET-Messung zwischen M₃-AChR-mTurq und GRK2-YFP

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-mTurq, GRK2-YFP und unmarkiertem G α_q , G β_1 und G γ_2 , wurden einem FRET-Experiment mit einem Intervall von 2 Hz unterzogen. Eine Stimulation des M₃-ACh-Rezeptors mit 10 μ M Acetylcholin führte zu einem reversiblen Anstieg im FRET (oberer Teil), der durch eine Zunahme der YFP-Fluoreszenz (gelbe Kurve) und die korrespondierende Abnahme der mTurq-Fluoreszenz (blaue Kurve) verifiziert werden konnte (unterer Teil).

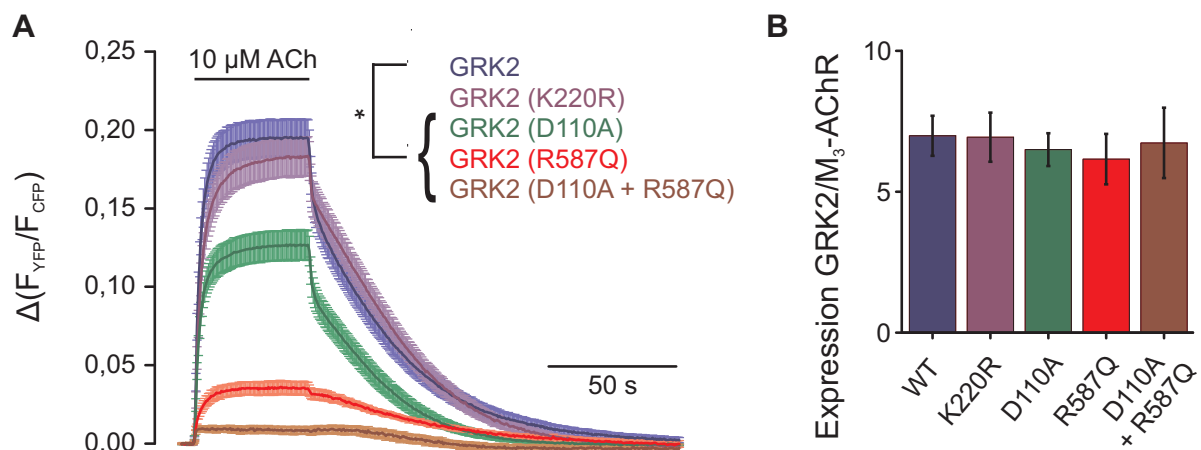


Abbildung 23: Amplitude des FRET-Signals und relatives Expressionslevel zwischen M₃-AChR-mTurq und den unterschiedlichen GRK2-YFP-Varianten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-mTurq, den YFP-markierten GRK2-Mutanten und unmarkiertem G α_q , G β_1 und G γ_2 , wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. **(A)** Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 12$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M₃-AChR mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). **(B)** Die Auswertung des relativen Expressionslevels ergab einen Überschuss an YFP-markierter GRK2 und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen (ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test, *: $p < 0,05$).

Die Ergebnisse waren insoweit unverändert, dass die FRET-Änderung mit der GRK2-Doppelmutante und GRK2 (R587Q) immer noch deutlich verringert war (Abbildung 23). Auch das FRET-Signal der $G\alpha_q$ -bindereduzierten Mutante war verglichen mit Wildtyp-GRK2 signifikant reduziert. Anders als in der vorherigen Messung (vgl. Abbildung 19) zeigten Wildtyp-GRK2 und GRK2 (K220R) jetzt sehr ähnliche Signale. Da die G-Protein-Interaktion der GRK2 (K220R) nicht beeinflusst ist, war, wie bereits beschrieben, dieses Ergebnis zu erwarten.

Die Auswertung von „Onset“-Kinetik und „Offset“-Kinetik der FRET-Signale ergab keine wesentlichen Änderungen im Vergleich zur vorherigen Messung (Abbildung 24). Die Daten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

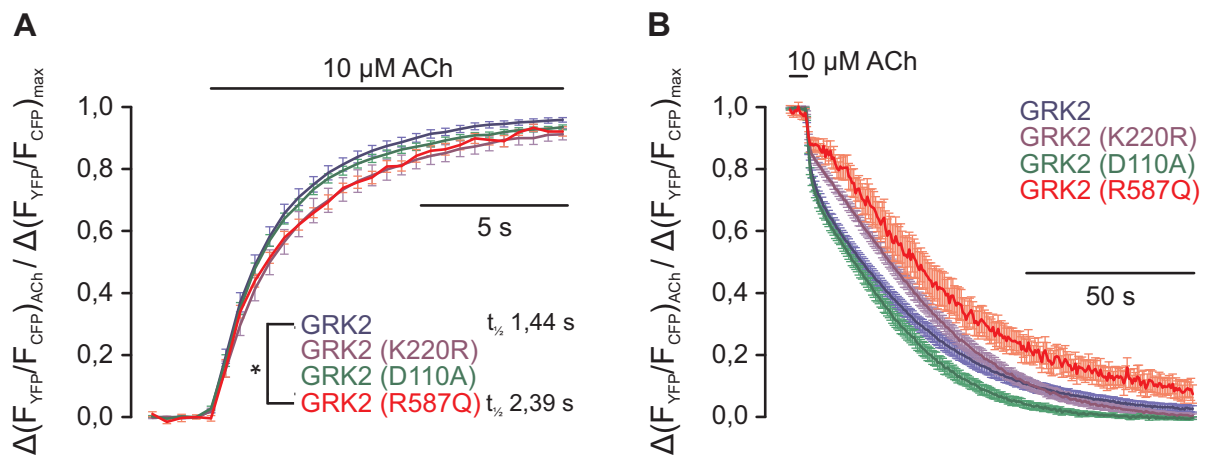


Abbildung 24: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M_3 -AChR-mTurq und den unterschiedlichen GRK2-Varianten

Zum Vergleich der „Onset“- (**A**) und „Offset“-Kinetik (**B**) des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 23 dargestellten FRET-Experiments wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 12$). Die statistische Auswertung der „Onset“-Kinetik erfolgte über einen monoexponentiellen Fit jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). Die „Offset“-Kinetik wurde über einen biexponentiellen Fit der Mittelwertskurve ausgewertet.

Tabelle 11: Auswertung der „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen M₃-AChR-mTurq und den unterschiedlichen GRK2-Varianten

Im Fall biexponentieller Kinetik sind erste und zweite Phase als (1) und (2) in Kombination mit dem jeweiligen Anteil der beiden Phasen an der Gesamtkinetik dargestellt. Wegen des vergleichsweise starken Rauschens war bei GRK2 (R587Q) keine biexponentielle Anpassung möglich.

	„Onset“-Kinetik		„Offset“-Kinetik		
	k (1/s) [MW ± S.E.M]	t _{1/2} (s)	k (1/s)		t _{1/2} (s)
GRK2	0,48 ± 0,06	1,44	(1) 1,1 (2) 0,02	16,7% 83,3%	0,6 28,9
GRK2 (K220R)	0,35 ± 0,06	2,01	(1) 2,3 (2) 0,007	4,8% 95,2%	0,3 91,3
GRK2 (D110A)	0,39 ± 0,02	1,76	(1) 0,8 (2) 0,02	12,6% 87,4%	0,9 40,5
GRK2 (R587Q)	0,29 ± 0,02	2,39	0,02		30,6

3.1.2.2 Einfluss der G_q-Protein-Untereinheiten

Um den Effekt von Gα_q auf die Interaktion zwischen Gα_q und GRK2 weiter zu untersuchen, wurde das oben beschriebene FRET-Experiment ohne Überexpression des kompletten G_q-Proteins, sowie ohne Gα_q bzw. Gβγ durchgeführt. Ohne G_q-Protein war die Amplitude des FRET-Signals deutlich reduziert (Abbildung 25A). Dies ist dadurch zu erklären, dass die endogenen G_q-Proteine nur einen geringen Anteil der GRK2 zu den Rezeptoren rekrutieren können. Auch wenn Gα_q bzw. Gβγ überexprimiert wurden, waren die FRET-Signale reduziert. Dies könnte wieder darauf hinweisen, dass beide benötigt werden, um die GRK2 effektiv an die Membran zu translozieren. Es ist aber auch möglich, dass unter diesen Bedingungen weniger funktionelle G-Proteine gebildet werden.

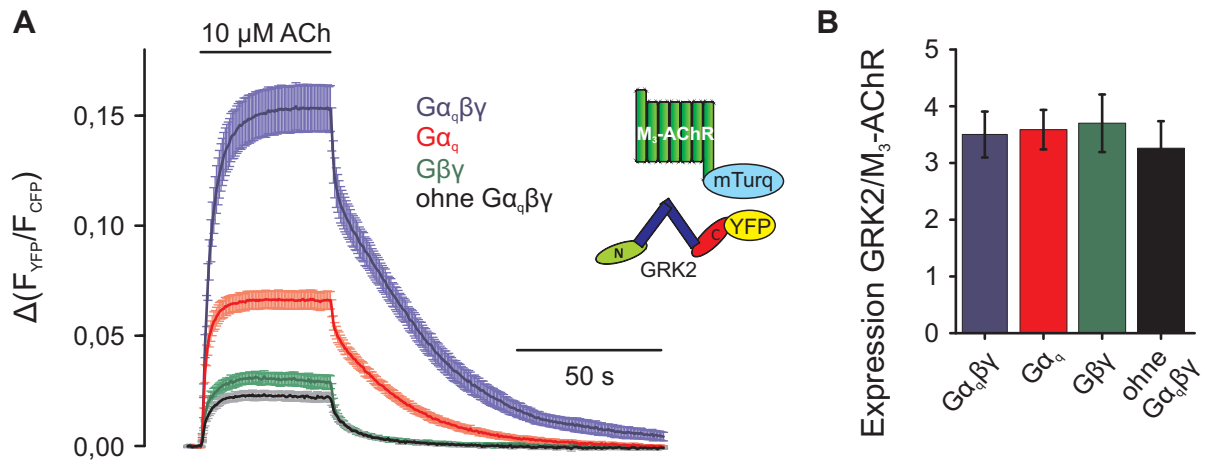


Abbildung 25: Amplitude des FRET-Signals und relatives Expressionslevel zwischen M_3 -AChR-mTurq und GRK2-YFP ohne Überexpression von $G\beta\gamma$, $G\alpha_q$ oder des kompletten Heterotrimers

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M_3 -AChR-mTurq, GRK2-YFP und unmarkiertem $G\alpha_q$, $G\beta\gamma$ oder dem kompletten Heterotrimer, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. **(A)** Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt ($\text{MW} \pm \text{S.E.M.}$; $n \geq 12$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 10 μM ACh dargestellt. **(B)** Die Auswertung des relativen Expressionslevels ergab einen Überschuss an YFP-markierter GRK2 und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen.

Ein deutlicher Effekt zeigte sich bei der Auswertung der „Offset“-Kinetik der verschiedenen Bedingungen (Tabelle 12). Im Vergleich zur Kontrollbedingung mit überexprimiertem G_q -Protein war die „Offset“-Kinetik ohne überexprimiertes G_q -Protein oder nur mit $G\beta\gamma$ signifikant beschleunigt (Abbildung 26). Die Bedingung mit überexprimiertem $G\alpha_q$ zeigte dagegen, die gleiche langsame Dissoziation von GRK2 wie in der Kontrollbedingung.

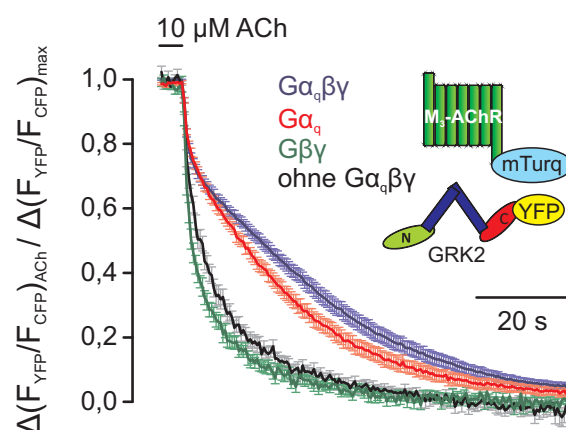


Abbildung 26: „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M_3 -AChR-mTurq und GRK2-YFP ohne Überexpression von $G\beta\gamma$, $G\alpha_q$ oder des kompletten Heterotrimers

Zum Vergleich der „Offset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 25 dargestellten FRET-Experiments wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt ($\text{MW} \pm \text{S.E.M.}$; $n \geq 12$). Die Auswertung erfolgte über einen biexponentiellen Fit der Mittelwertskurve.

Dieses Ergebnis zeigt, dass $G\alpha_q$ die Dissoziation von GRK2 verlangsamt. $G\alpha_q$ scheint also entscheidend zur Stabilität der Interaktion zwischen GRK2 und M_3 -ACh-Rezeptor beizutragen. Gegen diese Interpretation spricht, dass $G\alpha_q$ endogen bei jeder Bedingung exprimiert ist und dass deshalb bei jeder Bedingung ein gewisser Anteil der langsamen Komponente sichtbar sein sollte. Wenn die GRK2 allerdings in der Bedingung ohne überexprimierte G_q -Proteine in sehr großem Überschuss vorliegt, ist es möglich, dass das FRET-Signal der GRK2-Population, die von den endogenen G-Proteinen an die Membran rekrutiert wird, vom Anteil der GRK2 überdeckt wird, der ohne Hilfe der G-Proteine mit dem M_3 -Rezeptor interagiert.

Tabelle 12: Auswertung der „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen M_3 -AChR-mTurq und GRK2-YFP ohne Überexpression von $G\beta\gamma$, $G\alpha_q$ oder des kompletten Heterotrimers

Im Fall biexponentieller Kinetik sind erste und zweite Phase als (1) und (2) in Kombination mit dem jeweiligen Anteil der beiden Phasen an der Gesamtkinetik dargestellt.

	„Offset“-Kinetik		
	k (1/s)		$t_{1/2}$ (s)
$G\alpha_q\beta\gamma$	(1) 0,8 (2) 0,01	0,5% 99,5%	0,8 55,2
$G\alpha_q$	(1) 0,8 (2) 0,03	5,2% 94,8%	0,8 24,5
$G\beta\gamma$	(1) 0,7 (2) 0,08	45,5% 54,5%	1,0 8,7
ohne $G\alpha_q\beta\gamma$	(1) 0,5 (2) 0,08	40,2% 59,8%	1,3 8,5

Wenn $G\alpha_q$ die Interaktionsstabilität zwischen GRK2 und M_3 -ACh-Rezeptor erhöht, sollte auch die $G\alpha_q$ -binderereduzierte Mutante GRK2 (D110A) eine beschleunigte Dissoziations-Kinetik zeigen. Wie Abbildung 24 zeigt ist die „Offset“-Kinetik dieser Mutante allerdings nicht signifikant beschleunigt und steht damit im Gegensatz zur gerade beschriebenen These. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist, dass GRK2 (D110A) immer noch eine gewisse Interaktion mit $G\alpha_q$ zeigt, was in Abschnitt 3.1.4.2 näher untersucht wird. Eventuell ist die verbleibende Interaktion dieser Mutante mit $G\alpha_q$ ausreichend, um die Dissoziation vom M_3 -ACh-Rezeptor zu verlangsamen.

3.1.2.3 GRK2-bindedefiziente Mutante $G\alpha_q$ (P185K)

Zur Bestätigung der Ergebnisse und um den Effekt von $G\alpha_q$ auf die Interaktionsstabilität zwischen GRK2 und M_3 -ACh-Rezeptor genauer zu klären, wurde anschließend die $G\alpha_q$ -Mutante $G\alpha_q$ (P185K) (Day et al., 2004) eingesetzt, deren Bindeaffinität gegenüber der GRK2 herabgesetzt sein sollte. Zunächst zeigte sich auch mit dieser Mutante eine signifikante Beschleunigung der Dissoziations-Kinetik in der GRK2- M_3 -AChR-Interaktion (Abbildung 27). Letztendlich stellte sich aber heraus, dass diese Mutante, anders als es in der oben zitierten Publikation beschrieben ist, doch noch mit der GRK2 interagiert, aber schneller deaktiviert als Wildtyp- $G\alpha_q$. Die Versuchsergebnisse werden in Abschnitt 3.2 detailliert dargestellt. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt wäre, dass die Bindung von Wildtyp- $G\alpha_q$ und $G\alpha_q$ (P185K) an die GRK2 unterschiedlich ist. Durch die veränderte Interaktion könnte eine bisher nicht eindeutig belegte GAP-Aktivität der GRK2 ausgelöst werden, welche die beschleunigte G_q -Protein-Deaktivierung erzeugt. Die Mutante $G\alpha_q$ (P185K) konnte dementsprechend nicht zur Klärung des Effekts von $G\alpha_q$ auf die Interaktion zwischen GRK2 und M_3 -ACh-Rezeptor verwendet werden.

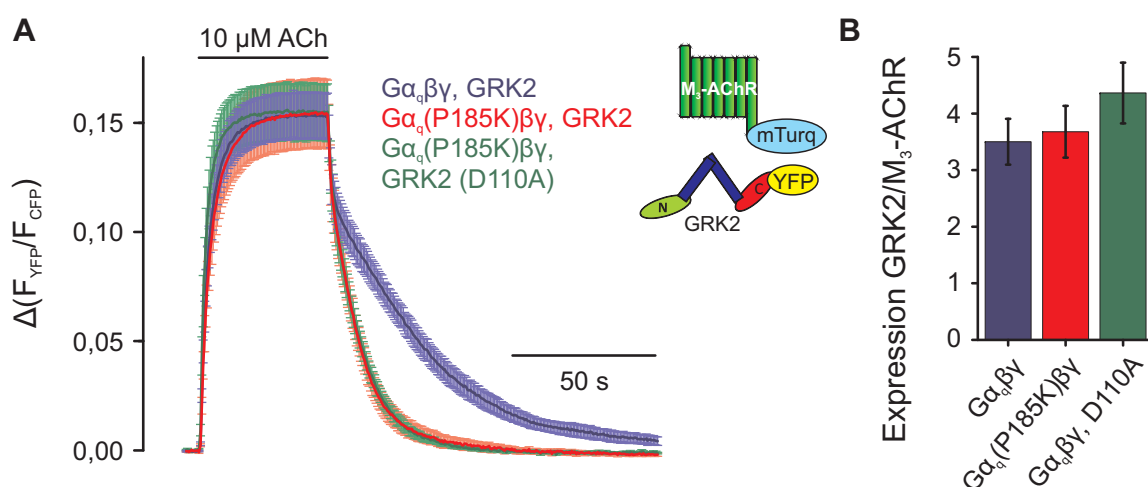


Abbildung 27: Amplitude des FRET-Signals und relative Expression zwischen M_3 -AChR-mTurq und GRK2-YFP bei Überexpression von $G\alpha_q$ (P185K)

HEK293T-Zellen transfiziert mit M_3 -AChR-mTurq, YFP markierter GRK2 oder GRK2 (D110A), $G\beta_1$, $G\gamma_2$ und Wildtyp- $G\alpha_q$ oder $G\alpha_q$ (P185K) wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. **(A)** Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 11$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M_3 -AChR mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. **(B)** Die Auswertung des relativen Expressionslevels ergab einen Überschuss an YFP-markierter GRK2 und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen.

3.1.3 Kinetik der Membrantranslokation der GRK2

Zur Bestätigung der Ergebnisse des zuvor beschriebenen FRET-Experiments wurde anschließend untersucht, ob die im FRET-Experiment gemessene Interaktion zwischen GRK2 und M₃-ACh-Rezeptor sich auch in der Translokation der GRK2 an die Membran widerspiegelt.

Aus diesem Grund wurden HEK293T-Zellen vergleichbar zum vorherigen FRET-Experiment transfiziert. Die unterschiedlichen GRK2-Mutanten wurden dabei in mTurquoise-markierter Variante eingesetzt. Konfokalmikroskopisch wurde mTurquoise in lebenden Einzelzellen angeregt und seine Fluoreszenz in hoher zeitlicher Auflösung gemessen, während die Zellen mit Tyrode beziehungsweise mit 10 µM ACh in Tyrode überspült wurden. Die Membrantranslokation der GRK2 wurde als Zunahme der Fluoreszenz an der Membran bei gleichzeitiger Abnahme der Fluoreszenz im Zytoplasma sichtbar. Die Auswertung der Translokation ist im Methodenteil detailliert beschrieben. Im Anschluss an die Messung wurde der YFP-markierte M₃-ACh-Rezeptor jeweils direkt angeregt, um das relative Expressionsverhältnis von Rezeptor und GRK2 ermitteln zu können.

In Abbildung 28 sind beispielhaft Aufnahmen der verschiedenen GRK2-Mutanten im unstimulierten und mit 10 µM ACh stimulierten Zustand dargestellt. Jedes Bild wurde als gemittelte Darstellung von fünf aufeinanderfolgenden Aufnahmen im jeweiligen Gleichgewichtszustand erzeugt.

Wie durch die Ergebnisse des FRET-Experiments zu erwarten, zeigten Wildtyp-GRK2 und GRK2 (K220R) nach Rezeptorstimulation eine deutliche Zunahme der GRK2-Fluoreszenz an der Membran, dementsprechend also eine ausgeprägte Membrantranslokation. Auch bei GRK2 (D110A) und GRK2 (R587Q) war eine deutliche Membrantranslokation erkennbar. Die GRK2-Doppelmutante zeigte im Gegensatz dazu nur eine schwache Translokation.

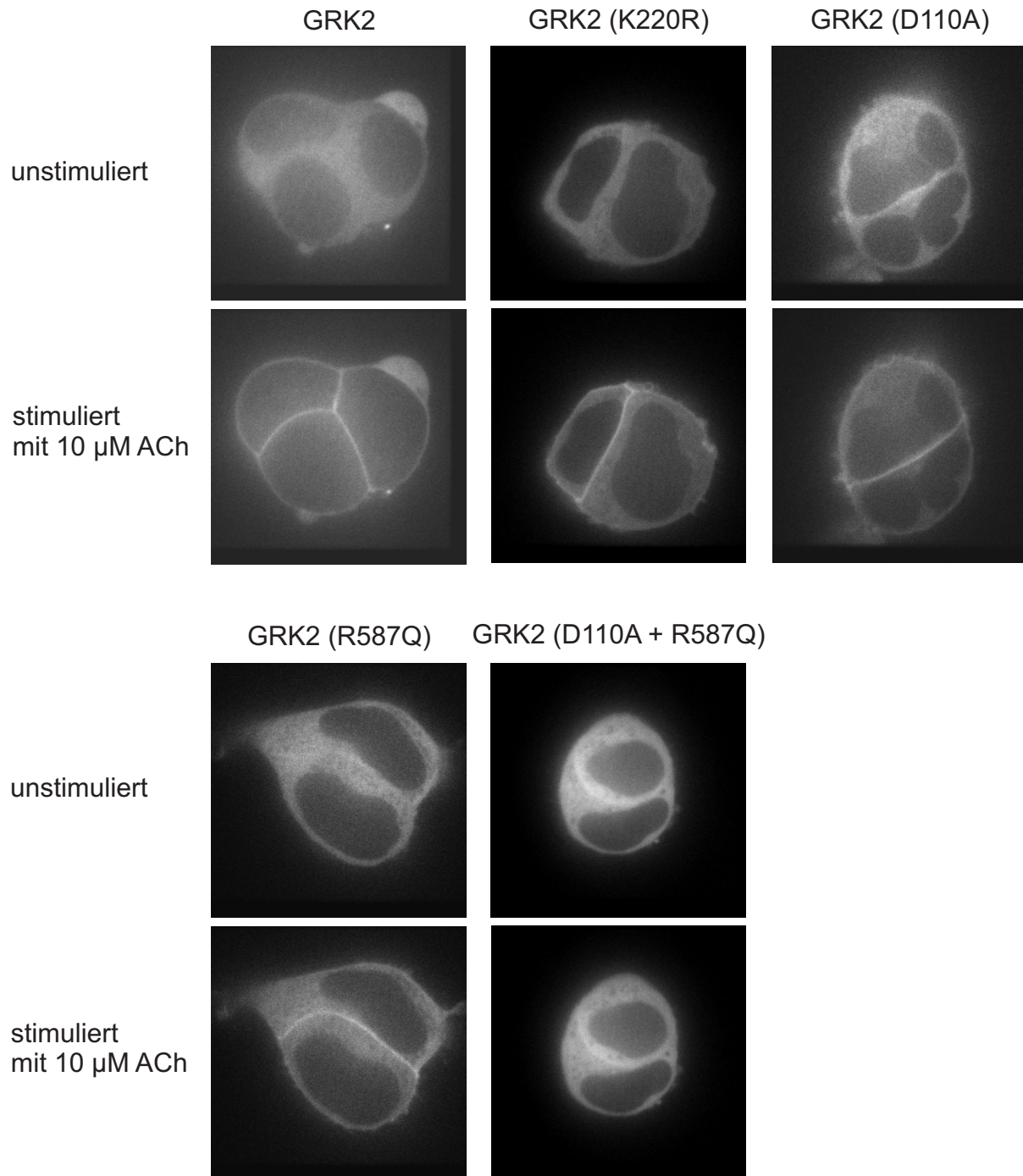


Abbildung 28: Agonistabhängige Membrantranslokation der unterschiedlichen GRK2-Varianten

HEK293T-Zellen wurden mit mTurq-markierter GRK2 oder GRK2-Mutanten, M_3 -AChR-YFP und unmarkiertem $G\alpha_q$, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ transfiziert. Dargestellt sind konfokale Aufnahmen lebender Einzelzellen vor und während der Stimulation mit 10 μ M Acetylcholin (gemittelte Darstellung von jeweils fünf aufeinander folgenden Aufnahmen einer Zeitreihe, VisiTech). Mit Ausnahme von GRK2 (D110A + R587Q) zeigten alle GRK2-Varianten eine deutliche, agonistabhängige Translokation an die Membran.

Die statistische Auswertung dieses Experiments ist in Abbildung 29 gezeigt und bestätigt die gerade beschriebenen Beobachtungen. Durch diese Ergebnisse wird also die Hypothese unterstützt, dass eine agonistabhängige Interaktion der GRK2 mit $G\beta\gamma$ oder mit $G\alpha_q$ zu einer Translokation der GRK2 an die Membran führt.

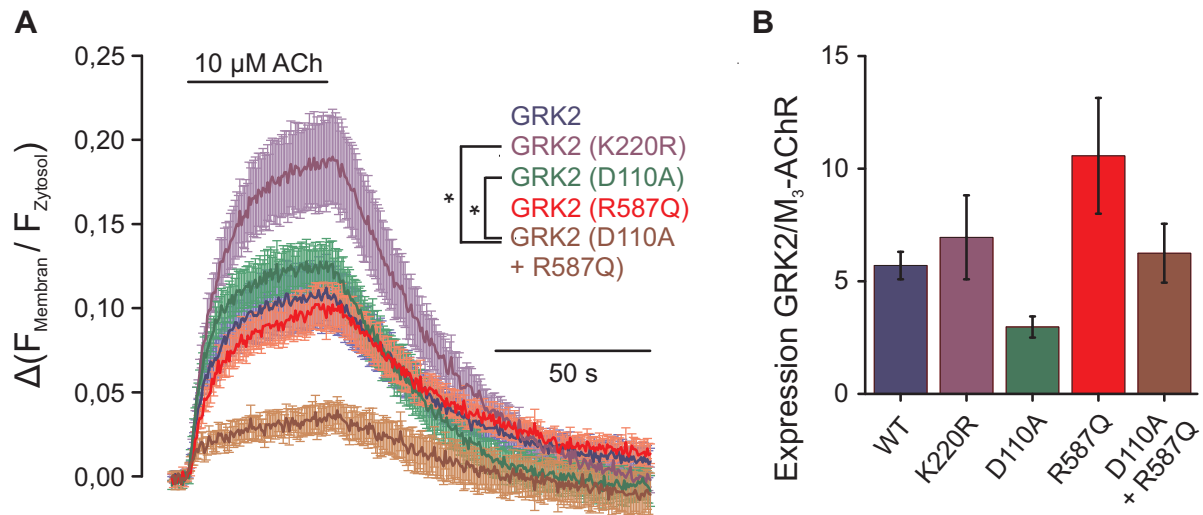


Abbildung 29: Zeitverlauf der Membrantranslokation der unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen wurden mit mTurq-markierter GRK2 oder GRK2-Mutanten, M₃-AChR-YFP und unmarkiertem $G\alpha_q$, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ transfiziert. **(A)** Mit einer Frequenz von 2 Hz wurden konfokale Aufnahmen lebender Einzelzellen erstellt. Dazu wurde mTurq bei 405 nm angeregt und die Fluoreszenz registriert. Zur Auswertung der Membrantranslokation der GRK2 wurde für jede Messung der Quotient $\frac{F_{\text{Membran}}}{F_{\text{Zytosol}}}$ gebildet. Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 10$) und die absolute Änderung des Ratios nach Stimulation mit 10 µM ACh dargestellt. **(B)** Die Auswertung des relativen Expressionslevels zeigte einen Überschuss an GRK2 gegenüber M₃-AChR.

3.1.4 Interaktion von GRK2 mit G $\beta\gamma$ und G α_q

Da, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, die Interaktion mit G $\beta\gamma$ oder mit G α_q eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung der GRK2 zum M₃-ACh-Rezeptor spielt, wurde im nächsten Schritt die Interaktion zwischen GRK2 und G $\beta\gamma$ bzw. G α_q näher untersucht.

Aus diesem Grund wurden FRET-Experimente zwischen diesen Proteinen etabliert. Für die Untersuchung der GRK2-G $\beta\gamma$ -Interaktion wurden HEK293T-Zellen mit Cerulean-markiertem G β_1 und GRK2-YFP, sowie unmarkiertem M₃-AChR, G α_q und G γ_2 transfiziert. Zur Untersuchung der GRK2-G α_q -Interaktion erfolgte eine Transfektion mit G α_q -YFP und GRK2-mTurq, sowie unmarkiertem M₃-ACh-Rezeptor, G β_1 und G γ_2 .

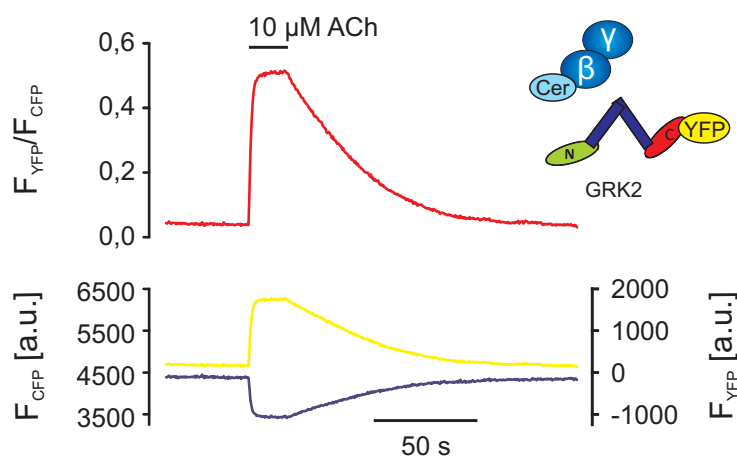


Abbildung 30: Repräsentative FRET-Messung zwischen GRK2-YFP und Cer-G β_1

HEK293T-Zellen, transfiziert mit Cer-G β_1 , GRK2-YFP, und unmarkiertem M₃-AChR, G α_q und G γ_2 , wurden einem FRET-Experiment mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Eine Stimulation des M₃-ACh-Rezeptors mit 10 μ M Acetylcholin führte zu einem reversiblen Anstieg im FRET, der die Interaktion zwischen GRK2 und G $\beta\gamma$ widerspiegelte.

Wie in Abbildung 30 und Abbildung 31 dargestellt, zeigten beide FRET-Experimente einen reversiblen Anstieg im FRET-Ratio während der Agonist-Zugabe, der die Interaktion zwischen GRK2 und G $\beta\gamma$ beziehungsweise zwischen GRK2 und G α_q widerspiegelt. In beiden FRET-Experimenten wurden anschließend die unterschiedlichen GRK2-Mutanten eingesetzt.

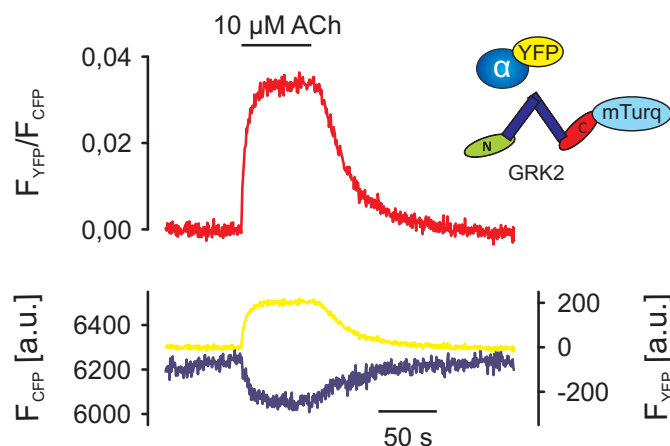


Abbildung 31: Repräsentative FRET-Messung zwischen GRK2-mTurq und $G\alpha_q$ -YFP

HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_q$ -YFP, GRK2-mTurq, und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$, wurden einem FRET-Experiment mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Eine Stimulation des M_3 -ACh-Rezeptors mit 10 μ M Acetylcholin führte zu einem reversiblen Anstieg im FRET, der die Interaktion zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ widerspiegelte.

3.1.4.1 GRK2- $G\beta\gamma$ -Interaktion

Im FRET-Experiment zwischen GRK2 und $G\beta\gamma$ war die Änderung im FRET-Ratio im Vergleich zu Wildtyp-GRK2 mit GRK2 (D110A + R587Q) und GRK2 (R587Q) deutlich reduziert (Abbildung 32A). Dies ist verständlich, da beide GRK2-Mutanten gegenüber $G\beta\gamma$ bindereduziert sind. Dieses Experiment weist dadurch gleichzeitig eine hohe Effektivität der eingeführten Punktmutation nach. Das FRET-Signal mit der $G\alpha_q$ -bindereduzierten GRK2 (D110A) war nicht signifikant unterschiedlich zu Wildtyp-GRK2. Dies zeigt, dass das Einfügen dieser Mutationen keine Auswirkung auf die Interaktion dieser Mutante mit $G\beta\gamma$ besitzt. Auch GRK2 (K220R) unterschied sich nicht signifikant von der Wildtyp-GRK2 (Abbildung 32B).

Die Auswertung des relativen Expressionslevels der unterschiedlichen Bedingungen ergab in allen Fällen einen Überschuss an YFP-markierter GRK2 gegenüber $G\beta\gamma$, so dass die Vergleichbarkeit der Größe des FRET-Signals zwischen den unterschiedlichen Bedingungen gewährleistet war (Abbildung 32C).

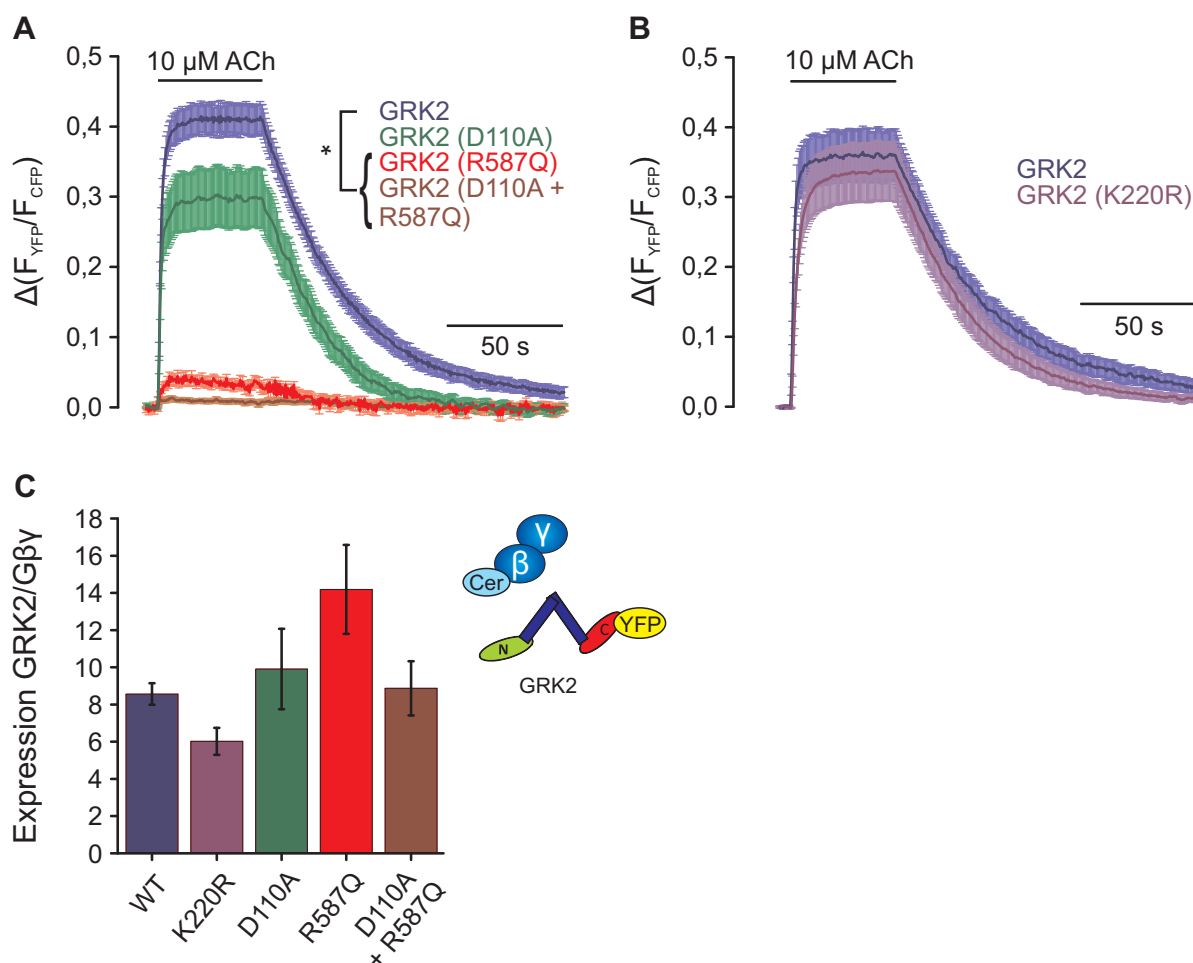


Abbildung 32: Amplitude des FRET-Signals zwischen G $\beta\gamma$ und den unterschiedlichen GRK2-Varianten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit Cer-G β_1 , den YFP-markierten GRK2-Mutanten und unmarkiertem M $_3$ -AChR, G α_q und G γ_2 , wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. **(A)** Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 10$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M $_3$ -AChR mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). **(B)** Die Einzelmessungen mit GRK2 (K220R) wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 11$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 10 μ M ACh im Vergleich zu den Messungen mit Wildtyp-GRK2, die am gleichen Tag gemessen wurden, dargestellt. **(C)** Die Auswertung der relativen Expressionslevel ergab für alle Bedingungen einen Überschuss an YFP-markierter GRK2.

3.1.4.2 GRK2-G α_q -Interaktion

Um die Spezifität des FRET-Signals zwischen GRK2 und G α_q nachzuweisen, wurde ein entsprechender FRET-Versuch zwischen GRK2 und G α_i durchgeführt (Abbildung 33D). Wie bereits beschrieben, findet zwischen diesen Proteinen keine Interaktion statt (Usui et al., 2000). Anstelle von M $_3$ -ACh-Rezeptor und G α_q wurden in diesem Fall α_{2A} -adrenerger Rezeptor und G α_{i1} transfiziert.

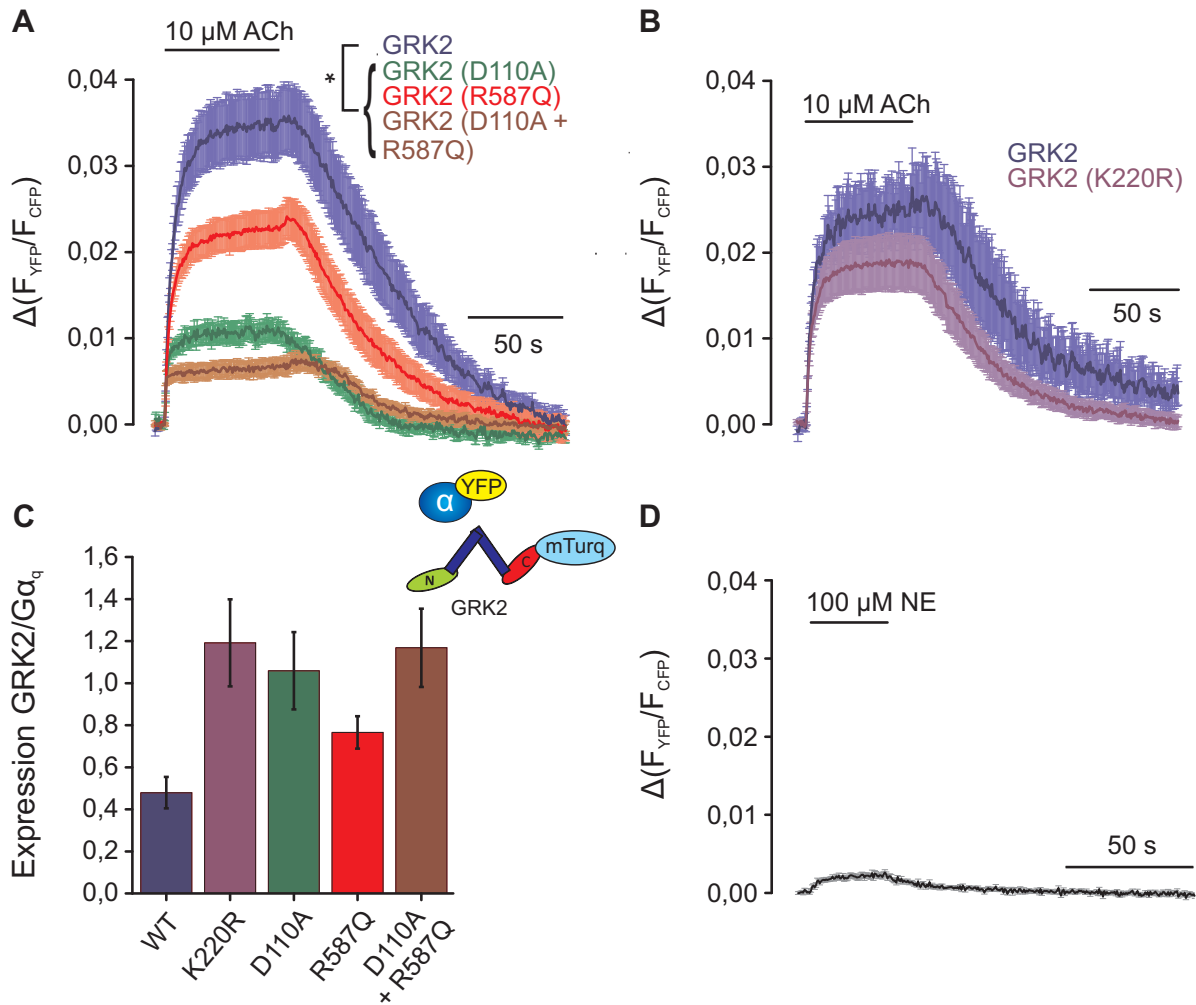


Abbildung 33: Amplitude des FRET-Signals zwischen $G\alpha_q$ und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_q$ -YFP, den mTurq-markierten GRK2-Mutanten und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. **(A)** Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 9$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M_3 -AChR mit 10 μ M ACh dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). **(B)** Die Einzelmessungen mit GRK2 (K220R) wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 11$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 10 μ M ACh im Vergleich zu den, an den gleichen Tagen aufgenommenen, Messungen mit Wildtyp-GRK2 dargestellt. **(C)** Die Auswertung der relativen Expressionslevel ergab ein etwa ausgeglichenes Verhältnis zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ oder einen leichten Überschuss an $G\alpha_q$ -YFP. **(D)** HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_{i1}$ -YFP, GRK2-mTurq, und unmarkiertem α_{2A} -AR, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Einzelmessungen wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 12$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 100 μ M NE dargestellt. Stimulation des α_{2A} -AR führte nur zu einem unwesentlichen Anstieg im FRET.

Die Stimulation des α_{2A} -AR mit 100 μ M Norepinephrin führte zur Rekrutierung der GRK2 zu den aktivierten Rezeptoren und damit in die Nähe der $G\alpha_i$ -Proteine. Wie in Abbildung 33D dargestellt, war im FRET-Experiment nur ein schwaches unspezifisches Signal detektierbar,

das sich in einem leichten agonistabhängigen Anstieg im FRET-Ratio äußerte. Es ist also von einer hohen Spezifität des FRET-Experiments zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ auszugehen.

Die beiden $G\alpha_q$ -bindereduzierten GRK2-Mutanten, GRK2 (D110A) und GRK2 (D110A + R587Q), zeigten bei diesem Experiment im Vergleich zu Wildtyp-GRK2 deutlich reduzierte agonistabhängige FRET-Signale (Abbildung 33A). Dies demonstriert wiederum die Effektivität der eingeführten Punktmutation auf die $G\alpha_q$ -Bindung. Anders als bei der R587Q-Mutante, ist im Fall der D110A-Mutante allerdings immer noch eine verbleibende Interaktion von etwa 30% feststellbar. Bei der Beurteilung der Experimente mit dieser Mutante ist also zu berücksichtigen, dass noch ein gewisser Anteil mit $G\alpha_q$ interagiert.

Auch das FRET-Signal der $G\beta\gamma$ -bindereduzierten Mutante GRK2 (R587Q) war signifikant gegenüber Wildtyp-GRK2 reduziert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die fehlende $G\beta\gamma$ -Interaktion ein geringerer Anteil dieser GRK2-Mutante an die Membran transloziert, wo die Interaktion mit $G\alpha_q$ stattfindet. Dennoch translozierten, verglichen mit dem Wildtyp, immer noch etwa 65% der Mutante an die Membran. Die Rekrutierung erfolgte in diesem Fall ausschließlich über $G\alpha_q$ und stellt einen weiteren Beweis dafür dar, dass $G\alpha_q$ alleine in der Lage ist, die GRK2 an die Membran zu translozieren. Die dominant-negative GRK2 (K220R) unterschied sich auch in Bezug auf die $G\alpha_q$ -Bindung nicht signifikant vom Wildtyp (Abbildung 33B). Das relative Expressionsverhältnis zwischen YFP und mTurquoise ist ausgeglichen oder weist einen Überschuss an YFP auf, so dass ein Einfluss des Expressionslevels auf die Amplitude der gemessenen FRET-Änderungen nicht zu erwarten ist (Abbildung 33C).

3.1.4.3 Vergleich der „Onset“- und „Offset“-Kinetik

In die Auswertung der Interaktions- und Dissoziations-Kinetik zwischen GRK2 und $G\beta\gamma$ bzw. $G\alpha_q$ wurden nur Wildtyp-GRK2 und die jeweiligen nicht binde-reduzierten GRK2-Mutanten einbezogen, da bei den anderen GRK2-Mutanten ein Einfluss der eingefügten Punktmutationen auf die Kinetik zu erwarten ist und eine exakte Auswertung derselben durch die geringe Amplitude des FRET-Signals zusätzlich erschwert ist (Tabelle 13).

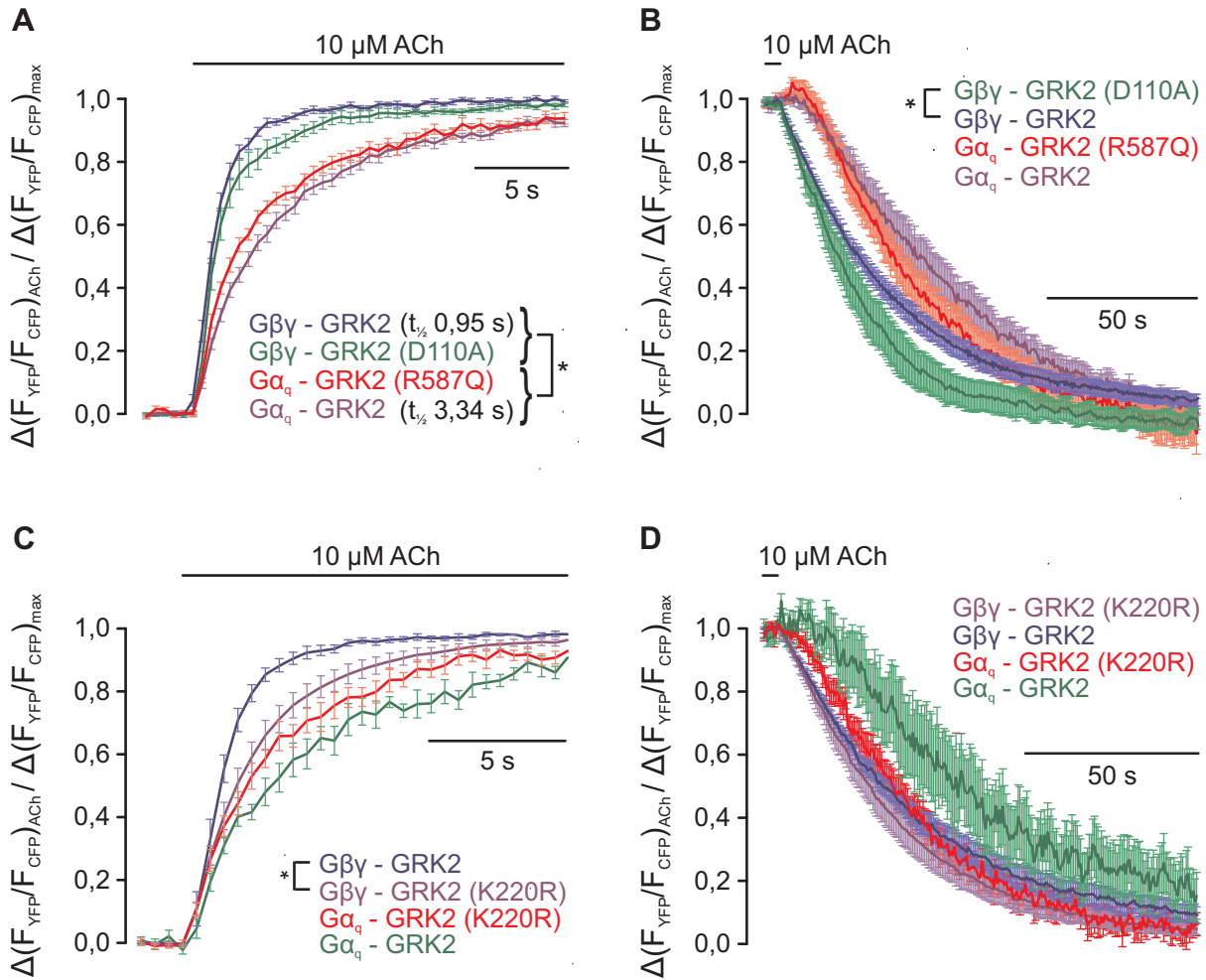


Abbildung 34: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen GRK2-Varianten mit $G\beta\gamma$ sowie $G\alpha_q$

Zum Vergleich der „Onset“- (A) und „Offset“-Kinetik (B) des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen der in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellten FRET-Experimente, wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 11$). In (C) und (D) sind die Bedingung mit GRK2 (K220R) im Vergleich zu den Messungen mit Wildtyp-GRK2 dargestellt, die am gleichen Tag gemessen wurden. Die statistische Auswertung der Kinetik erfolgte durch monoexponentielles Fitten jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$).

Bereits in Abschnitt 3.1.2 wurde angedeutet, dass die Rekrutierung der GRK2 an die Membran durch $G\alpha_q$ mit langsamerer Kinetik stattfindet, als die Rekrutierung der GRK2 durch $G\beta\gamma$. Dieses Ergebnis kann durch das hier beschriebene Experiment bestätigt werden. Die Interaktion von Wildtyp-GRK2 mit $G\alpha_q$ war mit $t_{1/2} = 3,34$ s mehr als dreimal langsamer als die Interaktion von Wildtyp-GRK2 mit $G\beta\gamma$ ($t_{1/2} = 0,95$ s) (Abbildung 34A). Die $G\beta\gamma$ -Bindung durch GRK2 (D110A) und die $G\alpha_q$ -Bindung durch GRK2 (R587Q) waren nicht signifikant unterschiedlich von Wildtyp-GRK2.

Tabelle 13: Auswertung der „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Interaktion der unterschiedlichen GRK2-Mutanten mit G $\beta\gamma$ sowie G α_q

GRK2-G $\beta\gamma$ -Interaktion	„Onset“-Kinetik		„Offset“-Kinetik	
	k (1/s) [MW \pm S.E.M]	t $\frac{1}{2}$ (s)	k (1/s) [MW \pm S.E.M]	t $\frac{1}{2}$ (s)
GRK2	0,73 \pm 0,05	0,95	0,028 \pm 0,002	25,1
GRK2 (K220R)	0,41 \pm 0,05	1,70	0,034 \pm 0,004	20,4
GRK2 (D110A)	0,57 \pm 0,06	1,21	0,043 \pm 0,006	16,3

GRK2-G α_q -Interaktion	„Onset“-Kinetik		„Offset“-Kinetik	
	k (1/s) [MW \pm S.E.M]	t $\frac{1}{2}$ (s)	k (1/s) [MW \pm S.E.M]	t $\frac{1}{2}$ (s)
GRK2	0,21 \pm 0,02	3,34	0,026 \pm 0,003	27,1
GRK2 (K220R)	0,30 \pm 0,04	2,35	0,029 \pm 0,002	23,9
GRK2 (R587Q)	0,25 \pm 0,02	2,79	0,026 \pm 0,002	27,1

Ein kinetischer Vergleich der G-Protein-Interaktion und der Rezeptor-Interaktion der beiden bindereduzierten GRK2-Mutanten zeigt, dass die Rezeptor-Interaktion von GRK2 (D110A) bereits kurz nach G $\beta\gamma$ -Bindung dieser Mutante stattfindet (Tabelle 14). Im Fall von GRK2 (R587Q) sind G α_q -Bindung und Rezeptor-Interaktion nicht signifikant unterschiedlich. Die G α_q -Bindung durch GRK2 (K220R) entsprach Wildtyp-GRK2, während die G $\beta\gamma$ -Bindung durch GRK2 (K220R) verglichen mit dem Wildtyp signifikant verlangsamt war (Abbildung 34C). Dieses Ergebnis passt dazu, dass auch die Interaktion von GRK2 (K220R) mit dem M $_3$ -AChR in der Tendenz verlangsamt war (Abbildung 24A), ist aber schwer erklärbar.

Die Ergebnisse dieses Experiments bestätigen erneut, dass beide G $_q$ -Protein-Untereinheiten die GRK2 an die Membran rekrutieren können. Die GRK2-Translokation findet allerdings mit unterschiedlicher Kinetik statt. Zudem zeigen die Daten, dass die Membranrekrutierung der GRK2 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Interaktion zwischen GRK2 und Rezeptor ist.

Tabelle 14: Vergleich der Interaktionskinetik von GRK2 (R587Q) und GRK2 (D110A) mit dem G_q-Protein sowie dem M₃-AChR

„Onset“-Kinetik	$t_{1/2}$ (s)
GRK2 (D110A):	
G $\beta\gamma$ -Interaktion	1,21
M ₃ -AChR-Interaktion	1,76
GRK2 (R587Q):	
G α_q -Interaktion	2,79
M ₃ -AChR-Interaktion	2,39

Die Dissoziations-Kinetiken von G $\beta\gamma$ ($t_{1/2}$ = 25,1 s) und G α_q ($t_{1/2}$ = 27,1 s) von GRK2 waren nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings dissoziierte G α_q gegenüber G $\beta\gamma$ deutlich verzögert (Abbildung 34B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass zwischen GRK2 und G α_q eine höhere Bindeaffinität besteht als zwischen GRK2 und G $\beta\gamma$. Die G α_q -Dissoziation von GRK2 (R587Q) unterschied sich nicht von Wildtyp-GRK2, während die Dissoziation zwischen G $\beta\gamma$ und GRK2 (D110A), verglichen mit Wildtyp-GRK2, signifikant schneller war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Bindung von G α_q durch GRK2 einen Einfluss auf die Stabilität der Interaktion zwischen GRK2 und G $\beta\gamma$ besitzt. GRK2 (K220R) war nicht signifikant unterschiedlich von Wildtyp-GRK2 (Abbildung 34D). Die kinetischen Daten sind in Tabelle 13 noch einmal zusammengefasst.

3.1.5 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Um weitere Informationen über die Interaktion der verschiedenen Interaktionspartner zu erhalten, wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven der beschriebenen FRET-Paare aufgenommen. Dazu wurden HEK293T-Zellen auf die gleiche Weise transfiziert, wie es bereits in den entsprechenden Abschnitten beschrieben wurde.

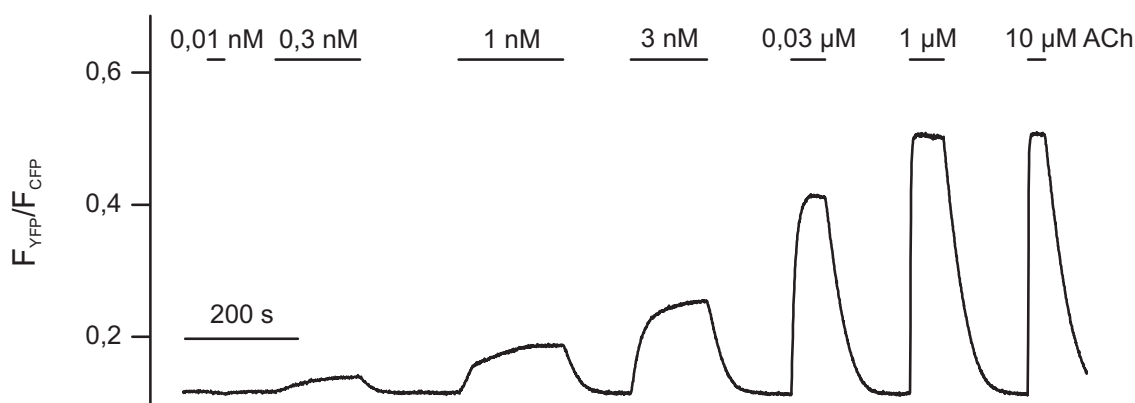


Abbildung 35: Repräsentative FRET-Messung zwischen Cer-G β_1 und GRK2-YFP zur Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve

Diese Abbildung wurde bereits im Methodenteil in Abschnitt 2.2.4.1.7 zur Beschreibung der Auswertung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven gezeigt. HEK293T-Zellen, transfiziert mit Cer-G β_1 , GRK2-YFP, und unmarkiertem M₃-AChR, G α_q und G γ_2 , wurden einem FRET-Experiment mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Acetylcholin stimuliert bis die maximale agonistinduzierte FRET-Änderung erreicht wurde.

Zur Messung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden lebende Einzelzellen mit steigenden Agonist-Konzentrationen stimuliert (Abbildung 35) und die agonistabhängigen absoluten FRET-Änderungen jeder Konzentration auf die FRET-Änderung der sättigenden Agonist-Konzentration normalisiert. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung findet sich im Methodenteil (Abschnitt 2.2.4.1.7).

Gegenüber der G α_q -GRK2-Interaktion war die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der G $\beta\gamma$ -GRK2-Interaktion signifikant rechtsverschoben (Abbildung 36, Tabelle 15), was dafür spricht, dass die GRK2 eine höhere Affinität zu G α_q als zu G $\beta\gamma$ besitzt. Eine höhere Bindeaffinität zwischen GRK2 und G α_q war schon in Abschnitt 3.1.4.3 durch die verzögerte Dissoziation dieser beiden Proteine vermutet worden und wird durch diese Ergebnisse bestätigt.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der M₃-AChR-GRK2-Interaktion war gegenüber den zuvor beschriebenen Kurven noch einmal signifikant rechtsverschoben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der M₃-AChR-Aktivierung gegenüber der G_q-Protein-Aktivierung signifikant rechtsverschoben ist (EC₅₀ ≈ 0,22 μM, Ziegler et al., 2011). Dies kann dadurch erklärt werden, dass ein bestimmter Anteil aktivierter Rezeptoren bereits ausreichend ist, um die maximale Aktivierung der G-Proteine zu erzielen. Zur maximalen Aktivierung der Rezeptoren sind aber höhere Agonist-Konzentrationen erforderlich. Dies erklärt auch, warum die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Rezeptor-Interaktionen deutlich rechtsverschoben ist.

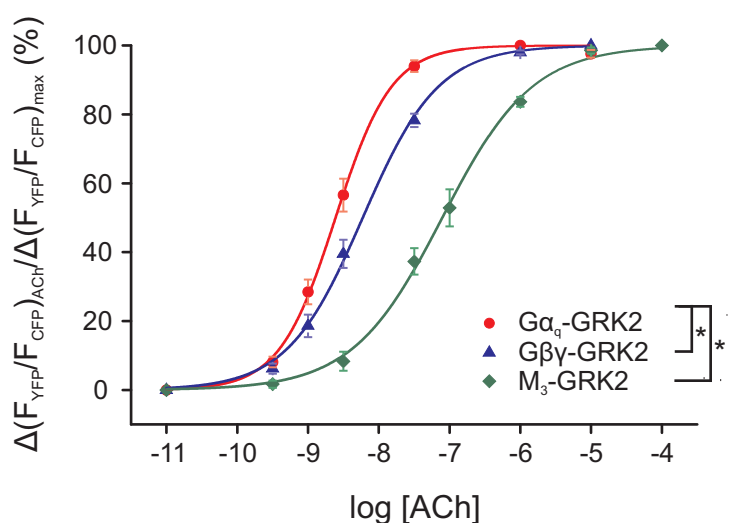


Abbildung 36: Konzentrations-Wirkungs-Kurven verschiedener FRET-Paare

HEK293T-Zellen, transfiziert wie zuvor bei den betreffenden Experimenten beschrieben, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Acetylcholin stimuliert bis die maximale agonistinduzierte FRET-Änderung erreicht wurde. Die absolute FRET-Änderung jeder Agonist-Konzentration wurde auf die FRET-Änderung der sättigenden Agonist-Konzentration normalisiert. Für jede Bedingung wurden die Daten der einzelnen Agonist-Konzentrationen gemittelt und graphisch dargestellt (MW ± S.E.M.; n≥9). Für die statistische Auswertung wurde der log (EC₅₀) jeder Einzelmessung bestimmt und eine ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: p<0,05) durchgeführt.

Tabelle 15: Auswertung der EC₅₀-Werte der in Abbildung 36 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Interaktion	log (EC ₅₀)	EC ₅₀
Gα _q -GRK2-Interaktion	-8,60 ± 0,07	2,52 nM ACh
Gβγ-GRK2-Interaktion	-8,24 ± 0,08	5,82 nM ACh
M ₃ -AChR-GRK2-Interaktion	-7,14 ± 0,09	71,9 nM ACh

3.1.6 Funktionelle Effekte der $G\alpha_q$ -Bindung an die GRK2

Im nächsten Schritt wurde die Frage untersucht, ob sich die Effekte von $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ auf die Membrantranslokation der GRK2 auch auf die Funktionalität der GRK2, also die Effektivität der Rezeptorphosphorylierung, auswirken. Aus diesem Grund wurde die agonistvermittelte Arrestinbindung des M_3 -ACh-Rezeptors in einem FRET-Experiment zwischen M_3 -AChR-mTurq und Arrestin3-YFP analysiert. Voraussetzung für die Bindung von Arrestin an den Rezeptor ist zum einen, dass der Rezeptor zuvor durch GRKs phosphoryliert wurde (Lohse et al., 1990), zum anderen die Aktivierung des Rezeptors durch einen Agonisten (Krasel et al., 2005). Die Rezeptorphosphorylierung ist im Gegensatz zur Arrestinbindung an den Rezeptor vergleichsweise stabil, so dass nach einer vorangegangenen Rezeptorstimulation präphosphorylierte Rezeptoren vorliegen, was bei nachfolgenden Rezeptorstimulationen zu einer schnelleren Arrestin-Rekrutierung führt (Krasel et al., 2005). Dies zeigt, dass sich Unterschiede in der Phosphorylierung der Rezeptoren in der Arrestinbindung dieser Rezeptoren widerspiegeln, so dass die Echtzeit-Messung der agonistabhängigen Arrestin-Rekrutierung eine sensitive Möglichkeit darstellt, die Funktionalität der unterschiedlichen GRK2-Mutanten zu untersuchen.

Zur Durchführung des Experiments wurden HEK293T-Zellen mit M_3 -AChR-mTurq, Arrestin3-YFP, unmarkierten G-Protein-Untereinheiten und GRK2 transfiziert. Wie in Abbildung 37A gezeigt, war zwischen den beiden FRET-Partnern ein agonistabhängiger Anstieg im FRET detektierbar, der die Arrestinbindung durch den Rezeptor widerspiegelte. Ein Vergleich der „Onset“-Kinetik nach erster und zweiter Rezeptorstimulation zeigte, dass die Beschleunigung der Arrestin-Rekrutierung bei der zweiten Stimulation auch für den M_3 -ACh-Rezeptor reproduzierbar war (Abbildung 37B, Tabelle 16).

Nachdem diese Voraussetzung erfüllt war, wurde überprüft, ob sich die Funktionalität der GRK2 auch in der Amplitude des agonistvermittelten FRET-Signals ausdrückt. Aus diesem Grund wurden anstelle von Wildtyp-GRK2 entweder keine GRK2 oder phosphorylierungsdefiziente GRK2(K220R) transfiziert. In beiden Fällen war die Amplitude des FRET-Signals signifikant reduziert, wodurch bestätigt wurde, dass die Kinaseaktivität der GRK2 durch dieses Experiment erfasst werden konnte (Abbildung 38A). Auch in Anwesenheit der $G\beta\gamma$ -binderreduzierten GRK2-Mutante und der Doppelmutante war das FRET-Signal deutlich reduziert, vergleichbar mit dem Level in Abwesenheit von GRK2. Dies

weist darauf hin, dass, obwohl die $G\beta\gamma$ -binderreduzierte GRK2-Mutante in der Lage ist, an die Membran zu translozieren, die Bindung von $G\beta\gamma$ eine Voraussetzung für die Phosphorylierung des Rezeptor ist. Interessanterweise ist aber auch das FRET-Signal in Anwesenheit der $G\alpha_q$ -binderreduzierten GRK2-Mutante signifikant reduziert. Dies spricht dafür, dass die Bindung von $G\beta\gamma$ alleine noch nicht für die volle Kinaseaktivität ausreichend ist, sondern dass diese durch die Bindung von $G\alpha_q$ weiter verstärkt wird.

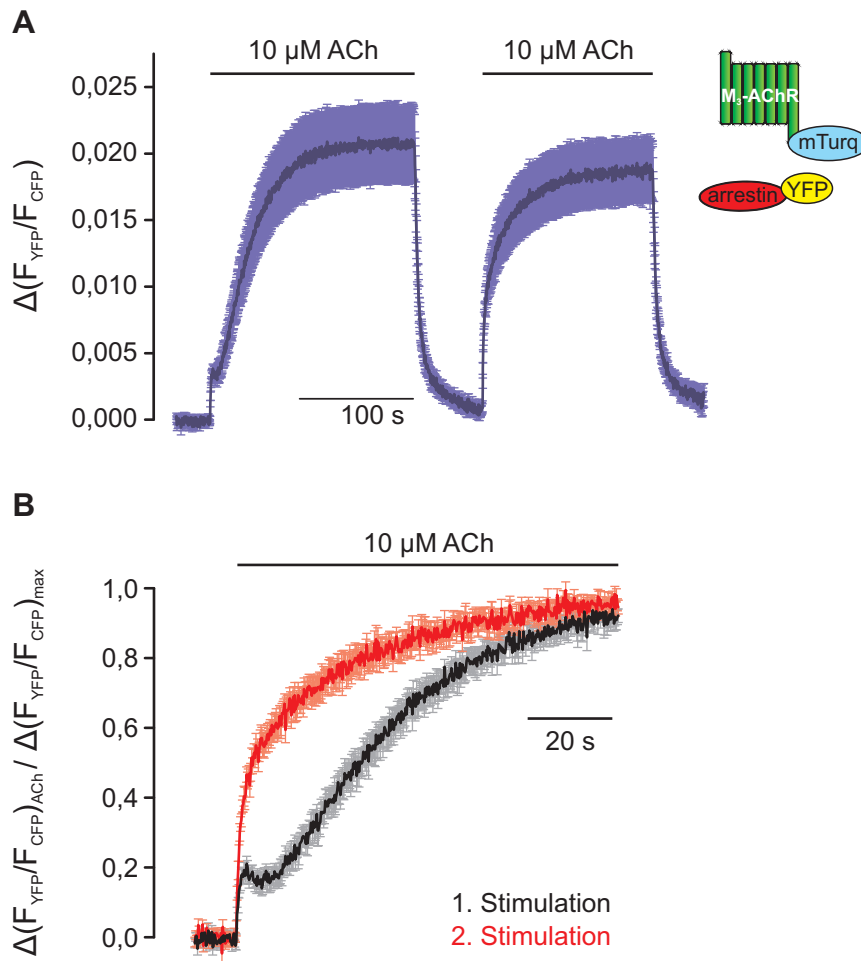


Abbildung 37: GRK2-vermittelte, agonistabhängige Arrestin-Rekrutierung zum M_3 -AChR

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M_3 -AChR-mTurq, Arrestin3-YFP unmarkiertem $G\alpha_q$, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ und GRK2, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 5 Hz unterzogen. **(A)** Die Einzelmessungen wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n=15$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M_3 -AChR mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. **(B)** Zum Vergleich der „Onset“-Kinetik des FRET-Signals nach erster und zweiter Stimulation wurden die in **(A)** dargestellten Einzelmessungen jeweils auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt.

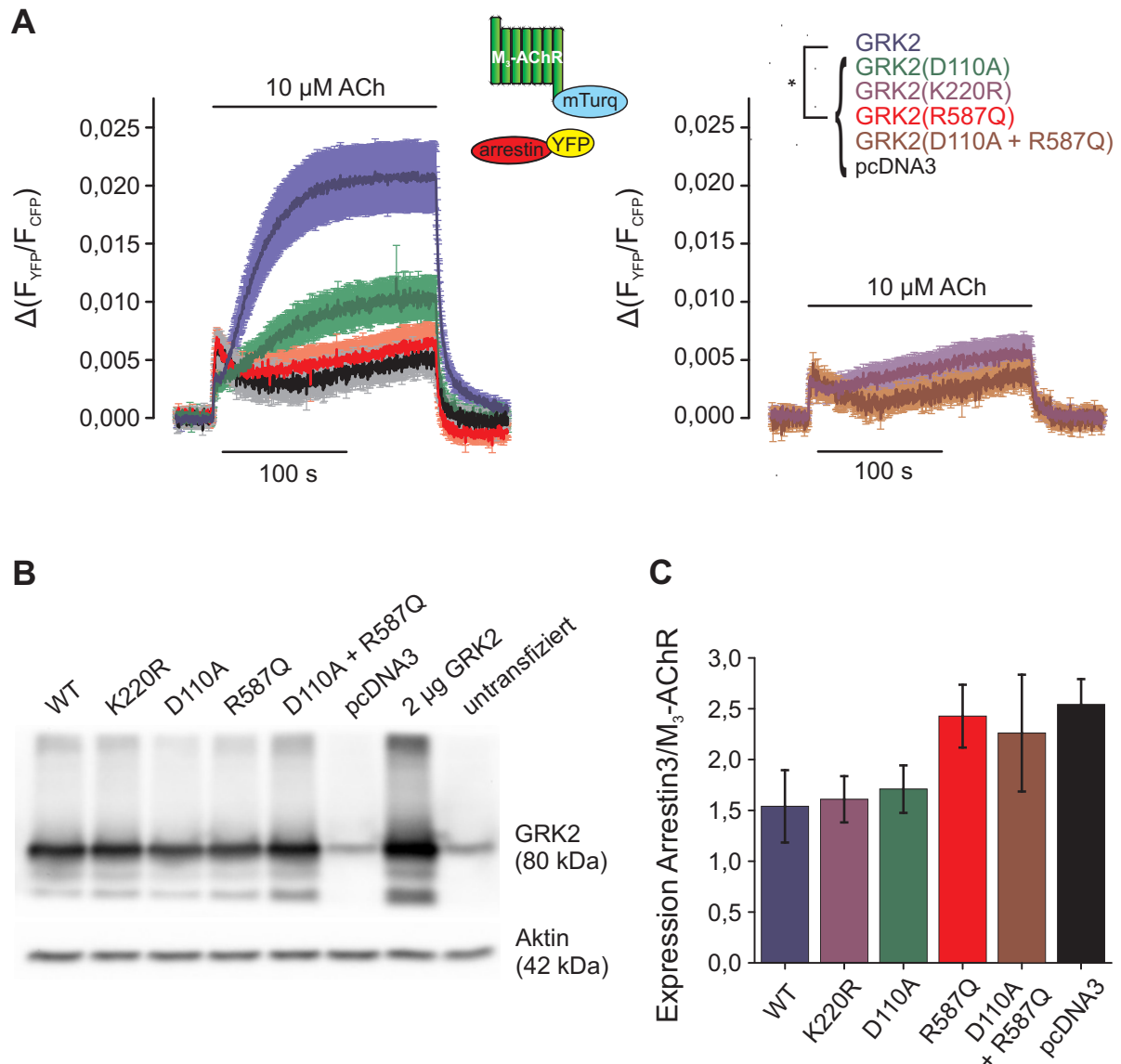


Abbildung 38: Agonistabhängige Arrestin-Rekrutierung an den M₃-AChR in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

(A) HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-mTurq, Arrestin3-YFP unmarkiertem G α_q , G β_1 und G γ_2 und GRK2, den unterschiedlichen GRK2-Mutanten oder pcDNA3, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 5 Hz unterzogen. Die Einzelmessungen wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 11$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M₃-AChR mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). (B) Repräsentativer Western-Blot zur Untersuchung der Expression der unterschiedlichen GRK2-Mutanten in HEK293T-Zellen, die wie in (A) transfiziert wurden. Zusätzlich wurden untransfizierte Zellen als Negativkontrolle und mit 2 μ g GRK2 transfizierte Zellen als Positivkontrolle verwendet. Als Erstantikörper dienten anti-GRK2 (C-15, sc-562, Santa Cruz) und anti-Aktin (clone C4, MB Biomedicals). (C) Die Auswertung der relativen Expressionslevel ergab einen Überschuss an YFP-markiertem Arrestin3 und keinen signifikanten Unterschied zwischen den Bedingungen.

Unterschiede in der Expression der unterschiedlichen GRK2-Mutanten wären ein entscheidender Einflussfaktor im Experiment. Da die GRK2 in diesem Fall nicht fluoreszenzmarkiert war, wurde die Expression der GRK2-Mutanten mit Hilfe von Western-Blots analysiert. Dazu wurden HEK293T-Zellen verwendet, die genauso wie im FRET-Experiment transfiziert worden waren. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle untransfizierte Zellen und mit einer großen Menge GRK2 transfizierte Zellen als Positivkontrolle verwendet. Als Primärantikörper wurde ein Kaninchen-GRK2-Antikörper (GRK2 C-15, sc-562, 1:200), als Sekundärantikörper ein gegen Kaninchen-Antikörper gerichteter Antikörper (goat anti-rabbit, HRP-conjugated, 1:2500) eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde gegen Aktin geblottet. Die Auswertung der durchgeführten Western-Blots ergab keine deutlichen Unterschiede in der Expression der verschiedenen GRK2-Varianten (Abbildung 38B). Die Negativkontrollen weisen nur schwache Banden durch endogen exprimierte GRK2 auf.

Tabelle 16: „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Arrestin-Rekrutierung an den M₃-AChR in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen Mutanten

	„Onset“-Kinetik		„Offset“-Kinetik	
	k (1/s) [MW ± S.E.M]	t _{1/2} (s)	k (1/s) [MW ± S.E.M]	t _{1/2} (s)
GRK2	0,032 ± 0,002 (1. Stim.) 0,051 ± 0,010 (2. Stim.)	21,4 13,7	0,246 ± 0,016 (1. Stim.)	2,82
GRK2 (K220R)			0,210 ± 0,025 (1. Stim.)	3,30
GRK2 (D110A)	0,019 ± 0,003 (1. Stim.) 0,043 ± 0,006 (2. Stim.)	35,7 16,1	0,235 ± 0,021 (1. Stim.)	2,95
GRK2 (R587Q)			0,275 ± 0,022 (1. Stim.)	2,52
GRK2 (D110A + R587Q)			0,242 ± 0,034 (1. Stim.)	2,86
pcDNA3			0,264 ± 0,056 (1. Stim.)	2,62

Die „Onset“-Kinetik scheint in Anwesenheit von Wildtyp-GRK2 schneller zu sein, als in Anwesenheit der GRK2-Mutanten. Das durch die kleine Amplitude bedingte stärkere Rauschen bei den GRK2-Mutanten erschwerte allerdings eine detaillierte Auswertung. Alle Bedingungen zeigten einen initialen, schnellen FRET-Anstieg, der sehr wahrscheinlich durch eine schnelle Arrestin-Rekrutierung durch präphosphorylierte Rezeptoren zustande kommt. Unerwartet war die nachfolgende Abnahme im FRET bei den Bedingungen ohne funktionelle GRK2, die möglicherweise durch eine Konkurrenz zwischen Arrestin und G-Proteinen oder GRK2 verursacht wurde. Unterschiede in der Expression zwischen Rezeptor und Arrestin können eher nicht zur Erklärung beitragen, da die Stöchiometrie in allen Bedingungen nicht signifikant unterschiedlich war (Abbildung 38C).

Die „Offset“-Kinetik ist zwischen den verschiedenen Bedingungen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 16). Dies ist leicht dadurch zu erklären, dass die unterschiedlichen GRK2-Mutanten zwar die Bindung von Arrestin an den Rezeptor beeinflussen, nach erfolgter Bindung hängt die Dissoziation aber alleine von der Bindeaffinität zwischen Rezeptor und Arrestin ab. Auffällig ist, dass die Dissoziation von Arrestin etwa 10-mal schneller erfolgt als die Dissoziation der GRK2 vom Rezeptor. Dies weist auf eine höhere Bindeaffinität zwischen GRK2 und Rezeptor im Vergleich zu Arrestin hin.

3.1.7 Effekte von $G\alpha_q$ auf die Interaktion der GRK2 mit dem M_2 -AChR

Nachdem im vorherigen Abschnitt der Beitrag von $G\alpha_q$ zu einer funktionellen Interaktion zwischen GRK2 und M_3 -ACh-Rezeptor gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob $G\alpha_q$ auch die Interaktion von GRK2 mit G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren beeinflusst. Um diese Frage zu klären, wurde in FRET-Experimenten die Interaktion von GRK2 mit dem M_2 -ACh-Rezeptor bei gleichzeitiger Anwesenheit von überexprimierten M_3 -ACh-Rezeptoren und G_q -Proteinen untersucht. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit M_2 -AChR-CFP, GRK2-YFP oder GRK2 (D110A)-YFP, sowie unmarkiertem M_3 -AChR, $G\alpha_q$, $G\alpha_o$, $G\beta_1$, und $G\gamma_2$ transfiziert.

Wie Abbildung 39 zeigt, bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Rezeptorinteraktion von Wildtyp-GRK2 und $G\alpha_q$ -bindereduzierter GRK2 (D110A), weder in Bezug auf die Amplitude des FRET-Signals noch auf die Kinetik der Interaktion. Dies weist darauf hin, dass $G\alpha_q$ keinen Einfluss auf die Interaktion von GRK2 mit G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren besitzt.

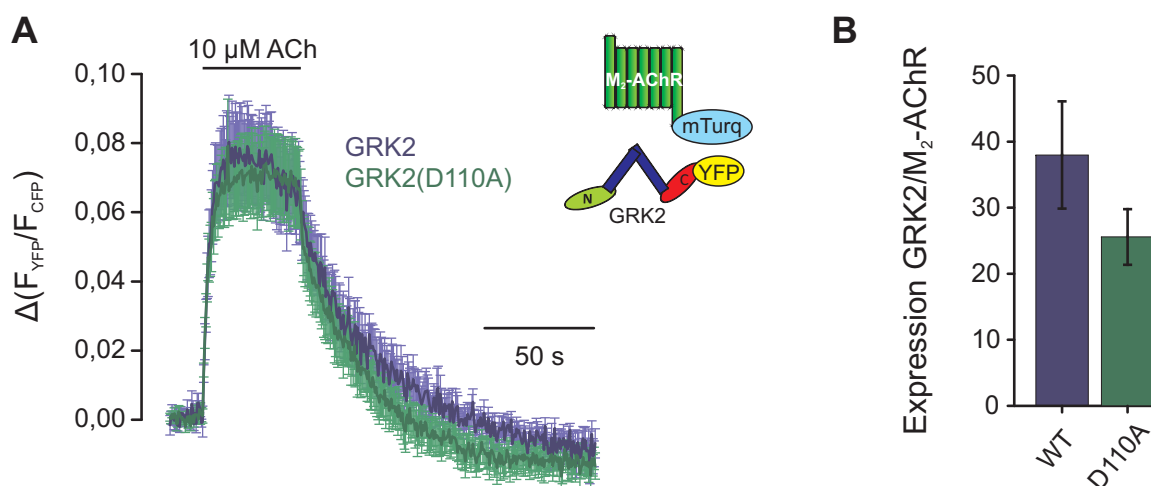


Abbildung 39: Einfluss von $G\alpha_q$ auf die agonistabhängige Interaktion zwischen GRK2 und M_2 -AChR

(A) HEK293T-Zellen, transfiziert mit M_2 -AChR-CFP, GRK2-YFP oder GRK2 (D110A)-YFP, unmarkiertem M_3 -AChR, $G\alpha_q$, $G\alpha_o$, $G\beta_1$, und $G\gamma_2$, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Einzelmessungen wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 14$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation von M_2 -AChR und M_3 -AChR mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung bzw. Kinetik jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). (B) Die Auswertung der relativen Expressionslevel ergab einen Überschuss an YFP-markierter GRK2 und keinen signifikanten Unterschied zwischen den Bedingungen.

Zusammengefasst konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht nur $G\beta\gamma$, sondern auch $G\alpha_q$ an der Membrantranslokation der GRK2 beteiligt ist. $G\alpha_q$ erhöht zudem das Ausmaß und die Stabilität der Interaktion zwischen GRK2 und M_3 -ACh-Rezeptor und verstärkt die Kinasefunktion der GRK2. Durch die hohe zeitliche Auflösung der durchgeführten FRET-Experimente konnte außerdem die Dynamik der Interaktionen quantifiziert werden und somit die spezifischen Effekte der $G\alpha_q$ -Bindung an die GRK2 auf die Kinetik nachgewiesen werden. Im zweiten Teil wurde eine detaillierte kinetische Analyse der GRK2-Rekrutierung zu G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren durchgeführt, um das Gesamtverständnis der daran beteiligten Schritte zu verbessern und die Beschreibung von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen zu unterstützen.

3.2 Erstellung eines kinetischen Modells der Rekrutierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2 zum M₃-ACh-Rezeptor

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Erstellung eines kinetischen Modells der Rekrutierung der GRK2 zum M₃-ACh-Rezeptor. Die computerbasierte Simulation der Reaktionskonstanten mit der Software Virtual Cell (Moraru et al., 2008) erfolgt dabei in Kooperation mit Dr. Dr. Leif Hommers vom Klinikum der Universität Würzburg. Bestandteil dieser Arbeit waren in erster Linie die Durchführung und Auswertung der für das Modell benötigten FRET-Experimente. Zusätzlich zu den im ersten Teil beschriebenen Experimenten wurden deshalb Versuche zur Interaktion inaktiver G_q-Proteine mit dem M₃-ACh-Rezeptor und zur Aktivierung der G_q-Proteine durchgeführt, um einen genaueren Einblick in den kinetischen Ablauf der GRK2-Rekrutierung zu erhalten. Außerdem wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Interaktion mit den unterschiedlichen GRK2-Mutanten erstellt, sowie die Kinetik bei unterschiedlichen Acetylcholin-Konzentrationen ausgewertet.

3.2.1 Interaktion von Gβγ mit M₃-AChR

Zur Analyse der Interaktion inaktiver G_q-Proteine mit dem M₃-ACh-Rezeptor nach Stimulation mit Acetylcholin wurde die Interaktion zwischen Gβγ und dem M₃-ACh-Rezeptor in Anwesenheit und Abwesenheit von GRK2 bzw. den unterschiedlichen GRK2-Mutanten durch FRET-Experimente näher untersucht. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit M₃-AChR-YFP, Cer-Gβ₁, und unmarkiertem Gα_q, Gγ₂, sowie GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten transfiziert. Zusätzlich wurde eine Bedingung ohne GRK2 transfiziert, indem diese durch leeren Vektor ersetzt wurde.

Die Bedingung ohne GRK2 zeigte nach Rezeptorstimulation mit 10 μM Acetylcholin einen schnellen Anstieg im FRET, der die Interaktion von inaktiven G_q-Proteinen mit dem M₃-ACh-Rezeptor widerspiegelt (Abbildung 40A und B). Alle getesteten Bedingungen außer GRK2 (R587Q) erreichten während der Stimulation ein stabiles Plateau. Die Amplituden der hervorgerufenen FRET-Signale dieser Bedingungen waren nicht signifikant unterschiedlich. Dass die Anwesenheit von GRK2 das resultierende FRET-Signal nur wenig beeinflusst, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Gβγ auf ähnliche Weise an den Rezeptor bindet, unabhängig davon, ob es in Komplex mit Gα_q oder in Komplex mit GRK2 mit dem Rezeptor interagiert. Dies kann durch das hier durchgeführte Experiment aber nicht eindeutig belegt

werden. Das FRET-Signal der Bedingung mit GRK2 (D110A + R587Q) stimmte mit der Bedingung ohne GRK2 überein. Dies war zu erwarten, da die Doppelmutante nur eine minimale Membrantranslokation gezeigt hatte.

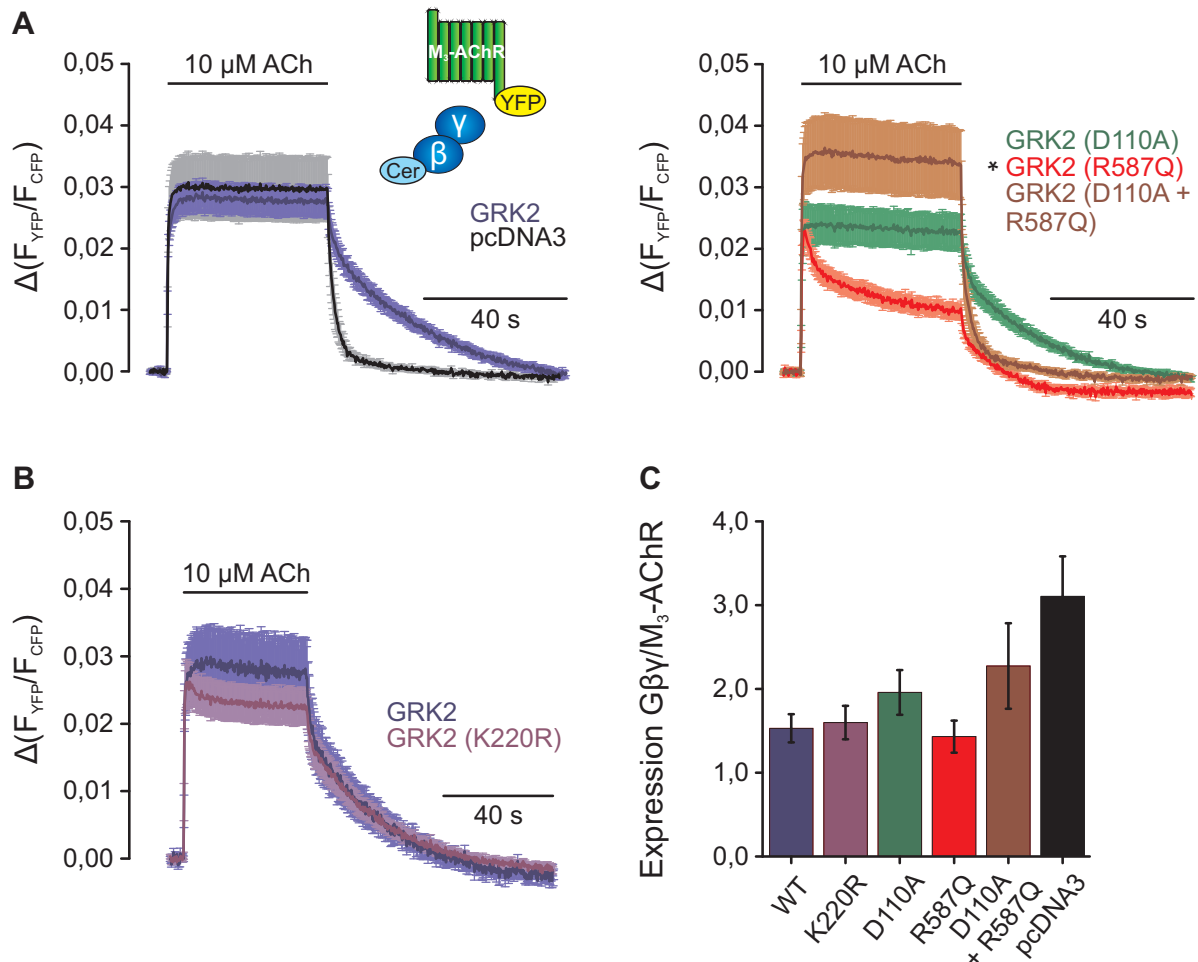


Abbildung 40: Amplitude des FRET-Signals und Expressionslevel zwischen Cer-Gβ₁ und M₃-AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-YFP, Cer-Gβ₁ und unmarkiertem Gα_q, Gγ₂ und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten oder pcDNA3, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 5 Hz unterzogen. **(A)** M₃-AChR Stimulation mit 10 μ M ACh führte zu einem Anstieg im FRET, der die Interaktion zwischen M₃-AChR und Gβ₁ widerspiegelte. Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt (MW \pm S.E.M.; n \geq 12). Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: p<0,05). **(B)** Die Einzelmessungen mit GRK2 (K220R) wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; n \geq 14) und die absolute FRET-Änderung im Vergleich zu den, an den gleichen Tagen aufgenommenen, Messungen mit Wildtyp-GRK2 dargestellt. **(C)** Die Auswertung der relativen Expressionslevel ergab für alle Bedingungen, aber besonders für die Bedingung mit pcDNA3, einen Überschuss an Cer-Gβ₁.

Das resultierende FRET-Signal in Anwesenheit von GRK2 (R587Q) unterschied sich deutlich von den zuvor beschriebenen Bedingungen. Mit dieser Mutante zeigte sich eine zweite Phase während der Agonist-Zugabe, die zu einer signifikanten Reduktion des FRET-Ratios führte. Die Kinetik dieser zweiten Phase ließ sich mit $t_{1/2} = 2,73$ s ($k = 0,25 \pm 0,04$ s⁻¹) bestimmen, womit sie im gleichen Bereich lag wie die Interaktions-Kinetik dieser GRK2-Mutante mit dem Rezeptor ($t_{1/2} = 2,39$ s). Dies deutet an, dass die zweite Komponente die Interaktion von GRK2 (R587Q) mit dem Rezeptor widerspiegelt. Im Unterschied zu den anderen getesteten GRK2-Mutanten weist GRK2 (R587Q) eine reduzierte G $\beta\gamma$ -Bindung auf und wird somit allein durch G α_q zum Rezeptor rekrutiert. Die Interaktion von GRK2 (R587Q) mit dem Rezeptor führt zu einer Verdrängung von G $\beta\gamma$, was in der Reduktion des FRET-Ratios sichtbar wird.

Die Auswertung des Expressionsverhältnisses zeigte einen Überschuss von Cerulean-markiertem G β_1 über M₃-AChR, welches bei der Bedingung ohne GRK2 besonders ausgeprägt war (Abbildung 40C). Aus diesem Grund wurde die Amplitude des FRET-Signals dieser Bedingung möglicherweise unterschätzt.

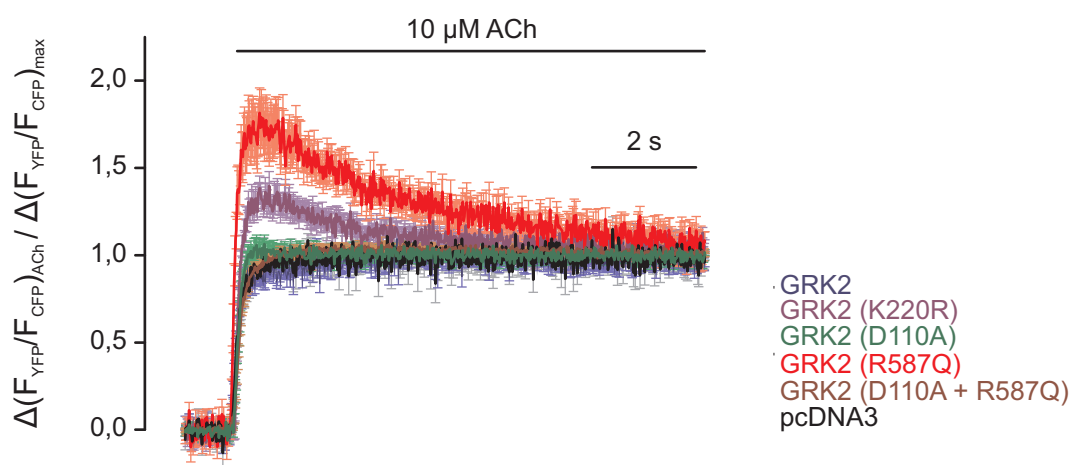


Abbildung 41: „Onset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Cer-G β_1 und M₃-AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-YFP, Cer-G β_1 und unmarkiertem G α_q , G γ_2 und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten oder pcDNA3, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 65 Hz unterzogen. Zum Vergleich der „Onset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 12$). Die statistische Auswertung der „Onset“-Kinetik erfolgte durch monoexponentielles Fitten jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$).

Tabelle 17: Auswertung der „Onset“-Kinetik der Interaktion zwischen Cer-G β ₁ und M₃-AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

„Onset“-Kinetik	k (1/s) [MW \pm S.E.M]	t _{1/2} (s)
GRK2	5,08 \pm 0,55	0,14
GRK2 (D110A)	8,87 \pm 1,40	0,08
GRK2 (D110 + R587Q)	6,62 \pm 0,79	0,11
pcDNA3	6,63 \pm 0,86	0,11

In der „Onset“-Kinetik zeigten sich mit t_{1/2} \approx 0,1 s keine signifikanten Unterschiede in Abwesenheit oder Anwesenheit von GRK2 (Abbildung 41, Tabelle 17). Auch mit den anderen getesteten Bedingungen ließen sich eine vergleichbare „Onset“-Kinetik feststellen. Dies ist leicht dadurch zu erklären, dass zu diesem frühen Zeitpunkt die GRK2 noch nicht an die Membran transloziert war und somit noch kein größerer Einfluss der GRK2 auf die Interaktion zu erwarten war. GRK2 (R587Q) und GRK2 (K220R) wurden aufgrund der auftretenden zweiten Phase nicht in die Auswertung einbezogen.

Auch in Bezug auf die „Offset“-Kinetik der G β γ -M₃-AChR-Interaktion waren deutliche Unterschiede in Abwesenheit oder Anwesenheit von GRK2 zu erkennen. Die Dissoziation von G β γ vom M₃-AChR erfolgte in Abwesenheit von GRK2 oder in Anwesenheit von GRK2 (D110A + R587Q) mit t_{1/2} = 1,0 s besonders schnell und folgte einem monoexponentiellen Verlauf (Abbildung 42, Tabelle 18). Diese beiden Bedingungen veranschaulichen dementsprechend die schnelle Dissoziation der aktivierten G_q-Proteine vom Rezeptor. In Anwesenheit von GRK2 oder GRK2 (D110A) dissoziierte G β γ deutlich langsamer und die „Offset“-Kinetik folgte einer biexponentiellen Funktion mit t_{1/2}(1) = 1,0 s und t_{1/2}(2) = 21,5 s (GRK2). Die Halbwertszeit der ersten schnellen Komponente entsprach der Halbwertszeit in Abwesenheit von GRK2. Dies spricht dafür, dass die schnelle Phase durch G β γ hervorgerufen wurde, das sich nicht in Komplex mit GRK2 befand. Der Hauptteil der Kinetik wurde allerdings durch den zweiten langsameren Teil bestimmt. Wie schon in Abschnitt 3.1.2 beschrieben geht die GRK2 eine stabile Interaktion mit dem Rezeptor ein. Gleichzeitig bindet sie G β γ . Die langsame Komponente in Anwesenheit von GRK2 kann also durch die stabile Interaktion von GRK2 mit dem Rezeptor erklärt werden, durch die gleichzeitig G β γ in der Nähe des Rezeptors festgehalten wird.

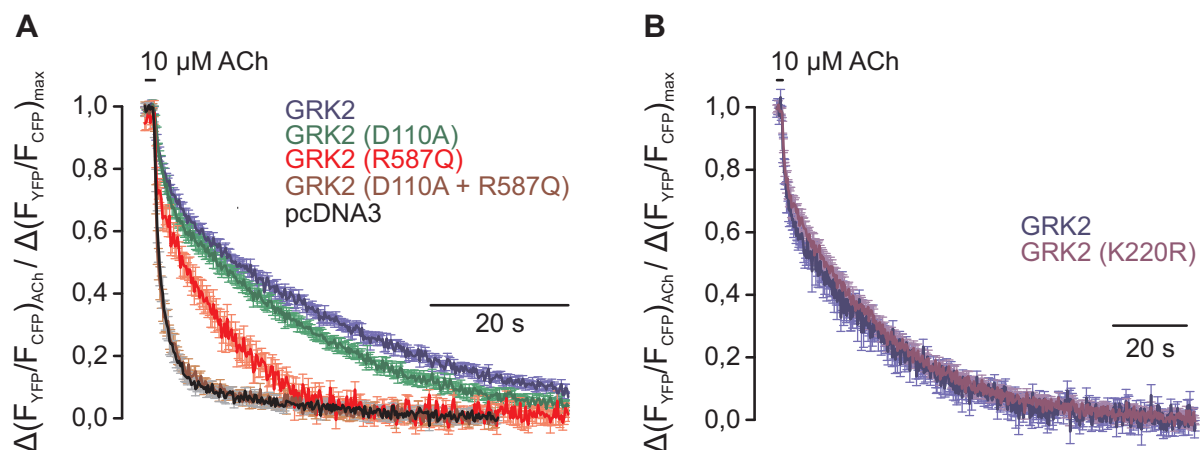


Abbildung 42: „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Cer-G β_1 und M $_3$ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

Zum Vergleich der „Offset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 40 dargestellten FRET-Experiments wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 12$). Die statistische Auswertung erfolgte durch biexponentielles Fitten der Mittelwertskurve.

Tabelle 18: Auswertung der „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen Cer-G β_1 und M $_3$ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

Im Fall biexponentieller Kinetik sind erste und zweite Phase als (1) und (2) in Kombination mit dem jeweiligen Anteil der beiden Phasen an der Gesamtkinetik dargestellt.

„Offset“-Kinetik	k (1/s)		$t_{1/2}$ (s)
GRK2	(1) 0,7 (2) 0,03	19,6% 80,4%	1,0 21,5
GRK2 (K220R)	(1) 1,1 (2) 0,03	17,2% 82,8%	0,6 21,8
GRK2 (D110A)	(1) 0,8 (2) 0,03	21,9% 78,1%	0,9 20,0
GRK2 (R587Q)	(1) 1,9 (2) 0,07	13,3% 86,7%	0,4 9,8
GRK2 (D110 + R587Q)	0,7		1,0
pcDNA3	0,7		1,0

Um diese Interpretation zu überprüfen, wurden die Dissoziations-Kinetik der GRK2-M₃-AChR-Interaktion und der Gβγ-M₃-AChR-Interaktion in Anwesenheit von GRK2 genauer verglichen (Abbildung 43). Beide Kurven zeigten sehr ähnliche Verläufe, wodurch bestätigt wird, dass GRK2 und Gβγ als Komplex eine stabile Interaktion mit dem Rezeptor eingehen. Gleichzeitig weist dieses Ergebnis darauf hin, dass der GRK2-Gβγ-Komplex gleichzeitig vom Rezeptor dissoziiert.

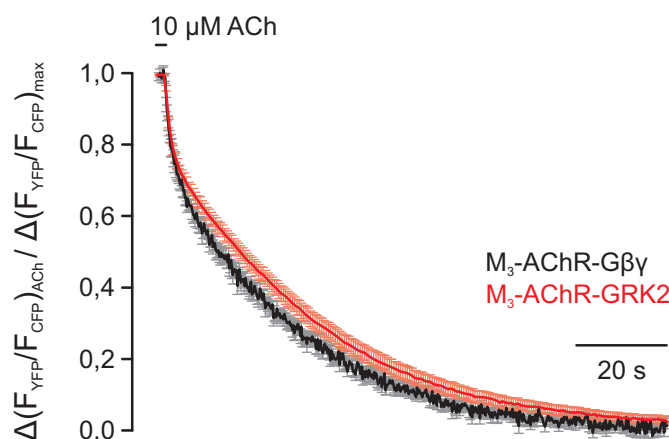


Abbildung 43: Vergleich der „Offset“-Kinetik der FRET-Signale zwischen M₃-AChR und GRK2 bzw. Gβγ in Anwesenheit von GRK2

Die „Offset“-Kinetik der FRET-Signale zwischen M₃-AChR und GRK2 (Abbildung 24) und M₃-AChR und Gβγ in Anwesenheit von GRK2 (Abbildung 42) wurden auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW ± S.E.M.; n≥12).

Auch GRK2 (R587Q) verlangsamt die Dissoziation von Gβγ im Vergleich zur Doppelmutante, allerdings in geringerem Maße als Wildtyp-GRK2 (Tabelle 18). Eine mögliche Erklärung stellt die verbleibende Gα_q-Bindung dar, die diese Mutante zum Rezeptor rekrutiert, wodurch die Dissoziation von Gβγ beeinflusst werden könnte.

Um das gerade beschriebene FRET-Experiment zu bestätigen, wurden die Versuche mit dem FRET-Partner CFP- $G\gamma_2$ anstelle von Cer- $G\beta_1$ wiederholt. Wie Abbildung 44 zeigt, sind die Ergebnisse mit dem vorherigen Experiment vergleichbar. Die Anwesenheit von GRK2 führte zu einer deutlichen Verlangsamung der „Offset“-Kinetik und GRK2 (R587Q) zeigte während der Stimulation eine zweite Phase, die zu einem Abfall des FRET-Ratios führte. Bei der Beurteilung der Ergebnisse dieses Experiments ist allerdings in Betracht zu ziehen, dass ein ungünstiges Expressionsverhältnis mit einem Überschuss an CFP vorlag. Eine Beeinflussung der Amplitude der FRET-Signale ist in diesem Fall also nicht auszuschließen.

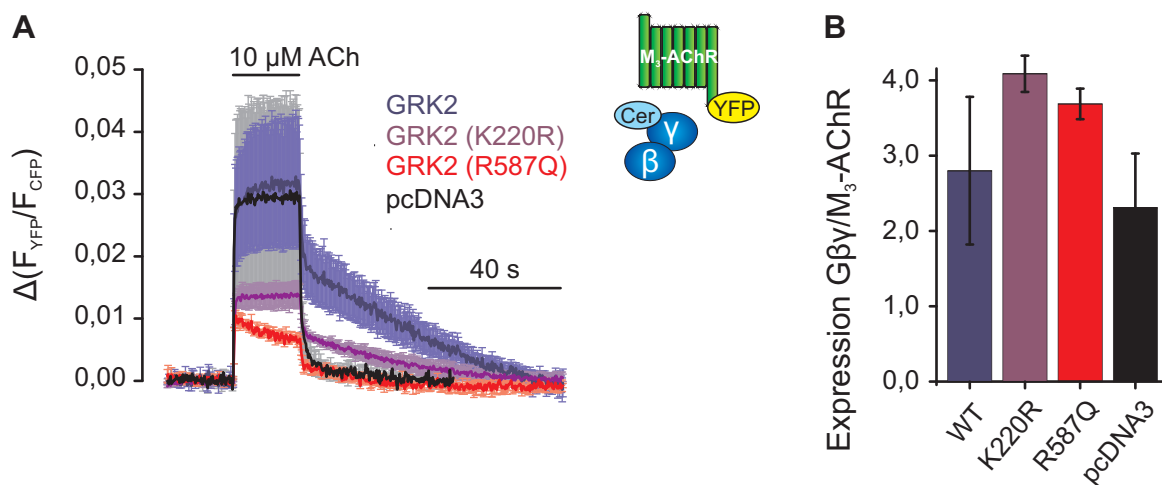


Abbildung 44: Amplitude des FRET-Signals und Expressionslevel zwischen CFP- $G\gamma_2$ und M_3 -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M_3 -AChR-YFP, CFP- $G\gamma_2$ und unmarkiertem $G\alpha_q$, $G\beta_1$ und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten oder pcDNA3, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 5 Hz unterzogen. **(A)** Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 2$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 10 μ M ACh dargestellt. **(B)** Die Auswertung der relativen Expressionslevel ergab für alle Bedingungen einen Überschuss an CFP-markiertem $G\gamma_2$.

3.2.2 Interaktion von $G\alpha_q$ mit M_3 -AChR

Entsprechend zu Abschnitt 3.1.6 sollte auch die Interaktion von $G\alpha_q$ mit dem M_3 -AChR mittels FRET-Experimenten untersucht werden. Aus diesem Grund wurden HEK293T-Zellen mit M_3 -AChR-YFP, $G\alpha_q$ -CFP und unmarkiertem $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ transfiziert.

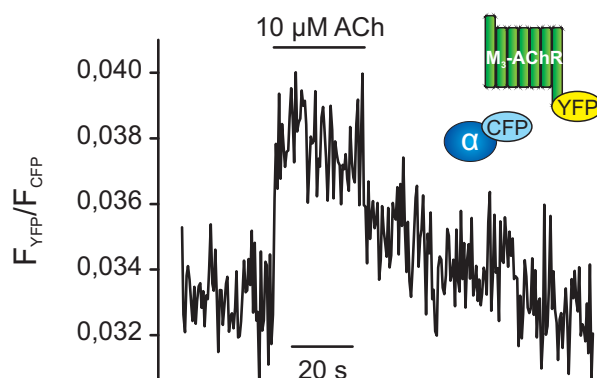


Abbildung 45: Beispiel einer FRET-Messung zwischen M_3 -AChR-YFP und $G\alpha_q$ -CFP

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M_3 -AChR-YFP, $G\alpha_q$ -CFP, und unmarkiertem $G\beta_1$ und $G\gamma_2$, wurden einem FRET-Experiment mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Eine Stimulation des M_3 -ACh-Rezeptors mit 10 μ M Acetylcholin führte zu einem leichten, reversiblen Anstieg im FRET, der die Interaktion zwischen M_3 -AChR und $G\alpha_q$ widerspiegelte.

Wie Abbildung 45 zeigt, konnte zwischen diesen FRET-Partnern, wenn überhaupt, nur ein kleines agonistabhängiges FRET-Signal gemessen werden, so dass keine reproduzierbare Durchführung dieses Experiments möglich war. Eine mögliche Ursache besteht darin, dass der Abstand zwischen beiden Fluorophoren im Komplex zu groß oder ihre Orientierung zueinander ungünstig war. Mit einem M_3 -AChR-Konstrukt, das nicht am C-Terminus, sondern in der dritten intrazellulären Schleife mit dem Fluorophor markiert war, konnte ein FRET-Signal zwischen diesen FRET-Partnern gezeigt werden (Tateyama und Kubo, 2013).

3.2.3 Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$

Im nächsten Schritt wurde in FRET-Experimenten der Einfluss von GRK2 auf die Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ untersucht. HEK293T-Zellen wurden dazu mit $G\alpha_q$ -YFP, Cer- $G\beta_1$, unmarkiertem M_3 -AChR, $G\gamma_2$ sowie GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten bzw. pcDNA3 transfiziert.

In Abwesenheit von GRK2 resultierte die Rezeptorstimulation mit 10 μ M ACh in einem FRET-Abfall von $\Delta(F_{YFP}/F_{CFP}) = -0,034 \pm 0,005$, der die Aktivierung des G_q -Proteins widerspiegelt (Abbildung 46A). Die Anwesenheit von GRK2 führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Amplitude des agonistabhängigen FRET-Signals um mehr als das Vierfache ($\Delta(F_{YFP}/F_{CFP}) = -0,153 \pm 0,009$). Dieser Effekt wurde bereits in (Jensen et al., 2009) beschrieben und beruht darauf, dass $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ in Abwesenheit der GRK2 nicht vollständig dissoziieren, sondern nur eine Konformationsänderung durchführen und dadurch nur ein vergleichsweise kleines FRET-Signal hervorrufen. Erst wenn durch Anwesenheit der GRK2 weitere Bindestellen für $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ zur Verfügung gestellt werden, kommt es zur vollständigen Separierung dieser beiden, wodurch die Vergrößerung des FRET-Signals erklärt werden kann. In diesem Zusammenhang ist es verständlich, dass das FRET-Signal in Anwesenheit von GRK2 (D110A + R587Q) sehr ähnlich zum Signal ohne GRK2 war. Die Bedingung mit GRK2 (K220R) (Abbildung 46B) war nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. In Anwesenheit von GRK2 (R587Q) oder GRK2 (D110A) lag das FRET-Signal zwischen den beiden anderen Bedingungen. GRK2 (R587Q) war dabei gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert, während GRK2 (D110A) eine Tendenz in die gleiche Richtung zeigte. Hier spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle, dass die $G\alpha_q$ -Bindung von GRK2 (D110A) nicht komplett aufgehoben ist (Abschnitt 3.1.4.2). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass eine vollständige Dissoziation des G_q -Proteins nur bei gleichzeitiger Bindung von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ an die GRK2 erfolgt. Aber auch bei alleiniger Bindung von $G\alpha_q$ oder $G\beta\gamma$ scheint im Vergleich zur Abwesenheit von GRK2 eine stärkere Trennung der beiden Untereinheiten stattzufinden. Die Auswertung der Expressionslevel ergab einen Überschuss an YFP-markiertem $G\alpha_q$ gegenüber Cer- $G\beta_1$, so dass ein Einfluss des Expressionslevels auf die Amplitude der FRET-Signale unwahrscheinlich ist (Abbildung 46C).

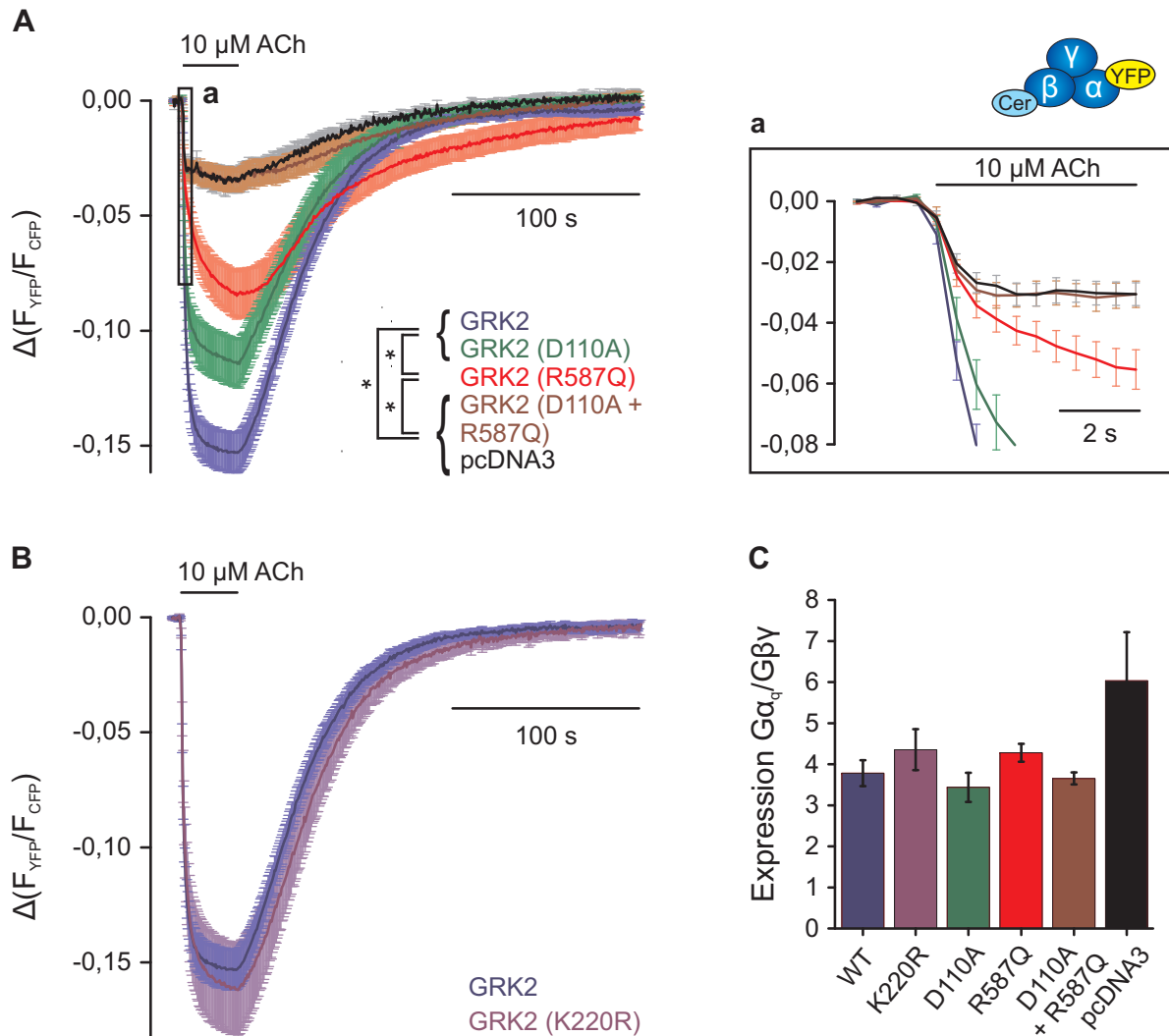


Abbildung 46: Amplitude des FRET-Signals und Expressionslevel zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_q$ -YFP, Cer- $G\beta_1$ und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\gamma_2$ und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten oder pcDNA3, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. **(A)** M_3 -AChR-Stimulation mit 10 µM ACh führte zu einer Abnahme im FRET, die eine Änderung in Abstand oder Orientierung von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ widerspiegelte. Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 10$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 10 µM Acetylcholin dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Bestimmung der absoluten FRET-Änderung jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$). **(Aa)** Vergrößerung der initialen „Onset“-Phase der in **(A)** gezeigten Mittelwertkurven. **(B)** Die Einzelmessungen mit GRK2 (K220R) wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 10$) und die absolute FRET-Änderung im Vergleich zu den Messungen mit Wildtyp-GRK2 dargestellt, die am gleichen Tag gemessen wurden. **(C)** Die Auswertung der relativen Expressionslevel ergab für alle Bedingungen einen Überschuss an YFP-markiertem $G\alpha_q$.

In Anwesenheit von GRK2 spiegelt das FRET-Signal zwei Vorgänge in der Zelle wider: Zunächst die Aktivierung des G_q -Proteins und nachfolgend die Bindung von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ an die GRK2. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, dass die „Onset“-Kinetik in Anwesenheit von GRK2 durch eine biexponentielle Funktion beschrieben werden kann, während sich bei Abwesenheit von GRK2 ein monoexponentieller Verlauf zeigt. Wie in Abbildung 46Aa dargestellt, erfolgte in Anwesenheit von GRK2 zunächst ein schneller Abfall des FRET-Ratios. Diese Komponente war mit der Kinetik in Abwesenheit von GRK2 vergleichbar und kann dementsprechend der Aktivierung des G_q -Proteins zugeordnet werden. Es folgte eine zweite Phase mit langsamerer Kinetik, die durch die nachfolgende Bindung des G_q -Proteins durch die GRK2 hervorgerufen wurde und zur Vergrößerung des FRET-Signals führte. Verglichen mit Wildtyp-GRK2 erschien mit GRK2 (R587Q) die Kinetik der zweiten Phase verlangsamt zu sein. Dies ließe sich dadurch erklären, dass in diesem Fall ausschließlich eine Bindung an $G\alpha_q$ stattfindet, was im Vergleich zur $G\beta\gamma$ -Bindung mit langsamerer Kinetik abläuft.

Um auszuschließen, dass die GRK2 bereits im unstimulierten Zustand $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ bindet und dadurch die Ergebnisse der FRET-Experimente beeinflusst, wurde das initiale FRET-Ratio jeder Einzelmessung bestimmt.

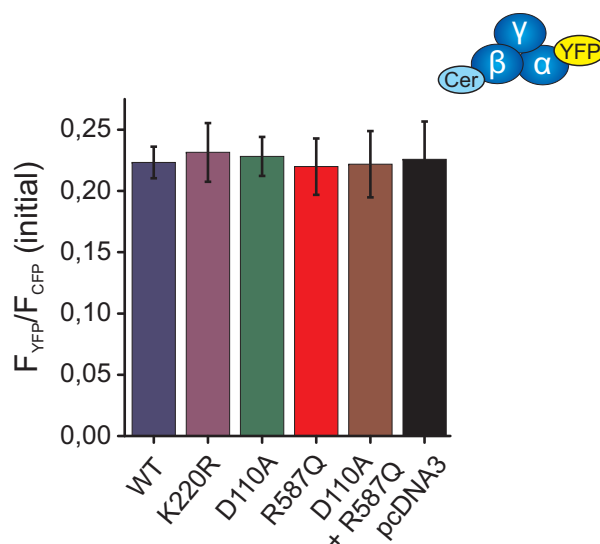


Abbildung 47: Initiales FRET-Ratio zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

Zum Vergleich des initialen FRET-Ratios der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 46 dargestellten FRET-Experiments wurde bei jeder Einzelmessung das FRET-Ratio zu Messbeginn bestimmt und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 10$).

Eine Interaktion zwischen GRK2 und den G_q -Protein-Untereinheiten würde sich in unterschiedlichen Ausgangsraten der verschiedenen Bedingungen ausdrücken. Wie Abbildung 47 zeigt, besteht kein Unterschied zwischen den Bedingungen. Dementsprechend darf angenommen werden, dass es im unstimulierten Zustand keinen Einfluss der GRK2 auf die Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ gibt, oder dass dieser zumindest in allen Fällen gleich ist.

Um die „Onset“-Kinetik der einzelnen Bedingungen genauer aufzuklären, wurden FRET-Experimente mit höherer Messfrequenz durchgeführt. In diesen Experimenten bestätigte sich der monoexponentielle Verlauf der „Onset“-Kinetik bei Abwesenheit von GRK2 oder Anwesenheit von GRK2 (D110A + R587Q), genauso wie die biexponentielle Kinetik in Anwesenheit von GRK2, GRK2 (K220R) und GRK2 (D110A) (Abbildung 48, Tabelle 19). Im Unterschied zum vorherigen Experiment ließ sich die Bedingung mit GRK2 (R587Q) in dieser Messreihe besser durch eine monoexponentielle als durch eine biexponentielle Kinetik wiedergeben.

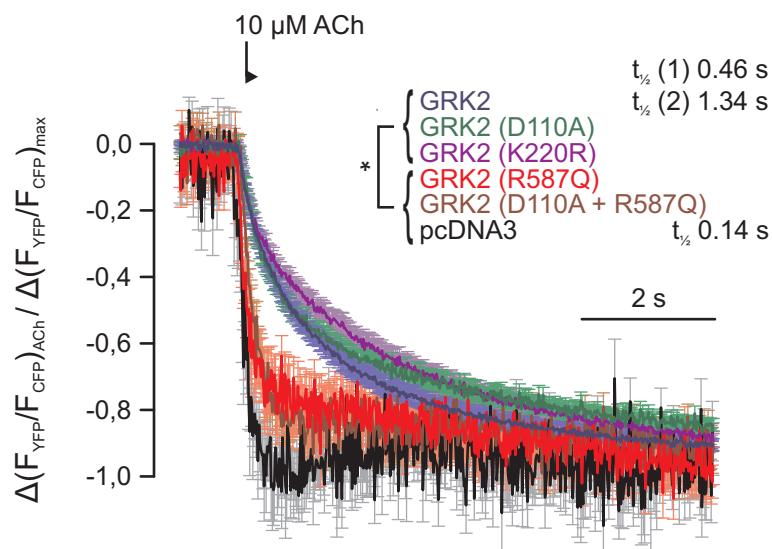


Abbildung 48: „Onset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_q$ -YFP, Cer- $G\beta_1$ und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\gamma_2$ und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten oder pcDNA3, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 65 Hz unterzogen. Zum Vergleich der „Onset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 10$). Die statistische Auswertung der „Onset“-Kinetik erfolgte durch monoexponentielles bzw. biexponentielles Fitten jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$).

Tabelle 19: Auswertung der „Onset“-Kinetik der Interaktion zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ in Anwesenheit der unterschiedlichen GRK2-Varianten

Im Fall biexponentieller Kinetik sind erste und zweite Phase als (1) und (2) in Kombination mit dem jeweiligen Anteil der beiden Phasen an der Gesamtkinetik dargestellt.

	„Onset“-Kinetik		
	k (1/s) [MW \pm S.E.M]		t _{1/2} (s)
GRK2	(1) 1,51 \pm 0,18 (2) 0,52 \pm 0,09	39,6% 60,4%	0,46 1,34
GRK2 (K220R)	(1) 2,40 \pm 0,39 (2) 0,30 \pm 0,06	19,8% 80,2%	0,29 2,29
GRK2 (D110A)	(1) 1,86 \pm 0,20 (2) 0,12 \pm 0,01	43,9% 56,1%	0,37 5,64
GRK2 (R587Q)	4,24 \pm 0,44		0,16
GRK2 (D110 + R587Q)	4,30 \pm 0,41		0,16
pcDNA3	5,10 \pm 0,60		0,14

Zur Auswertung der „Offset“-Kinetik wurde das zu Beginn beschriebene FRET-Experiment mit langsamerem Messintervall herangezogen (Abbildung 46). Die getesteten Bedingungen ließen sich bezüglich ihrer „Offset“-Kinetik in zwei Gruppen einteilen (Abbildung 49). Die Bedingungen ohne GRK2 sowie mit GRK2 (D110A + R587Q) und mit GRK2 (R587Q) zeigten eine langsame „Offset“-Kinetik mit t_{1/2} \approx 50 s (Tabelle 20). Im Gegensatz dazu war die „Offset“-Kinetik in Anwesenheit von GRK2, GRK2 (K220R) oder GRK2 (D110A) etwa doppelt so schnell. Dies könnte durch eine gewisse GAP-Aktivität der GRK2 auf $G\alpha_q$ bedingt sein, obwohl in der Literatur bisher nur wenige Hinweise auf eine derartige Funktion zu finden sind.

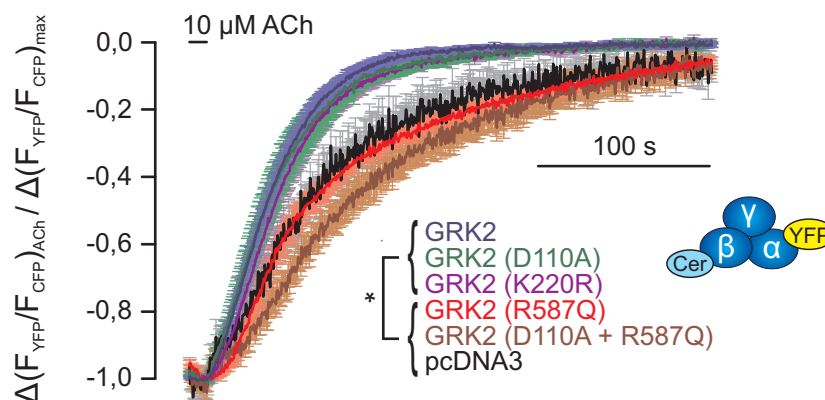


Abbildung 49: „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ in Anwesenheit der unterschiedlichen GRK2-Varianten

Zum Vergleich der „Offset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 46 dargestellten FRET-Experiments wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 10$). Die statistische Auswertung erfolgte durch monoexponentielles Fitten jeder Einzelmessung und anschließende ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$).

Tabelle 20: Auswertung der „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ in Anwesenheit der unterschiedlichen GRK2-Varianten

	„Offset“-Kinetik	
	k (1/s) [MW \pm S.E.M]	$t_{1/2}$ (s)
GRK2	0,029 \pm 0,003	23,8
GRK2 (K220R)	0,031 \pm 0,002	22,6
GRK2 (D110A)	0,035 \pm 0,004	19,73
GRK2 (R587Q)	0,015 \pm 0,001	46,2
GRK2 (D110 + R587Q)	0,010 \pm 0,002	66,7
pcDNA3	0,014 \pm 0,003	47,9

Die in den bisher beschriebenen FRET-Experimenten bestimmten Daten zur „Onset“- und „Offset“-Kinetik sind zur besseren Übersicht in Tabelle 21 zusammengefasst. Im Fall einer biexponentiellen Kinetik sind erste und zweite Phase als (1) und (2) in Kombination mit dem jeweiligen Anteil der beiden Phasen an der Gesamtkinetik dargestellt.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Kinetischen Daten

Interaktion	GRK2 k (1/s) [MW ± S.E.M.]	t _{1/2} (s)	GRK2 (K220R) k (1/s) [MW ± S.E.M.]	t _{1/2} (s)	GRK2 (D110A) k (1/s) [MW ± S.E.M.]	t _{1/2} (s)	GRK2 (R587Q) k (1/s) [MW ± S.E.M.]	t _{1/2} (s)	GRK2 (D110A + R587Q) k (1/s) [MW ± S.E.M.]	t _{1/2} (s)	pcDNA3 k (1/s) [MW ± S.E.M.]	t _{1/2} (s)
M₃-Gβγ	onset	5,08 ± 0,55	0,14	10,28 ± 1,44	0,08	0,07	9,90 ± 1,11	0,07	6,62 ± 0,79	0,11	6,63 ± 0,86	0,11
	offset (1)	0,7 (19,6%)	1,0	1,1 (17,2%)	0,6	0,9	1,9 (13,3%)	0,4	0,7	1,0	0,7	1,0
	(2)	0,03 (80,4%)	21,5	0,03 (82,8%)	21,8	20,0	0,07 (86,7%)	9,8				
M₃-GRK2	onset	0,48 ± 0,06	1,44	0,35 ± 0,06	2,01	1,76	0,29 ± 0,02	2,39				
	offset (1)	1,1 (16,7%)	0,6	2,3 (4,8%)	0,3	0,9	0,8 (12,6%)					
	(2)	0,02 (83,3%)	28,9	0,007 (95,2%)	91,3	40,5	0,02 (87,4%)	30,6				
GRK2-Gβγ	onset	0,73 ± 0,05	0,95	0,41 ± 0,05	1,70	1,21	0,57 ± 0,06					
	offset	0,028 ± 0,002	25,1	0,034 ± 0,004	20,4	16,3	0,043 ± 0,006					
GRK2-Gα_q	onset	0,21 ± 0,02	3,34	0,30 ± 0,04	2,35		0,25 ± 0,02	2,79				
	offset	0,026 ± 0,003	27,1	0,029 ± 0,002	23,9		0,026 ± 0,002	27,1				
Gα_q-Gβγ	onset (1)	1,51 ± 0,18 (39,6%)	0,46	2,40 ± 0,39 (19,8%)	0,29	0,37	4,24 ± 0,44	0,16	4,30 ± 0,41	0,16	5,10 ± 0,60	0,14
	(2)	0,52 ± 0,09 (60,4%)	1,34	0,30 ± 0,06 (80,2%)	2,29	5,64	0,12 ± 0,01 (56,1%)					
	offset	0,029 ± 0,003	23,8	0,031 ± 0,002	22,6	19,73	0,015 ± 0,001	46,2	0,010 ± 0,002	66,7	0,014 ± 0,003	47,9

3.2.4 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Zusätzlich zu den in Abschnitt 3.1.5 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven war zur Simulation der Reaktionskonstanten der einzelnen Interaktionen die Aufnahme von weiteren Konzentrations-Wirkungs-Kurven erforderlich, unter anderem von der Aktivierung des G_q -Proteins sowie von Interaktionen der GRK2-Mutanten. HEK293T-Zellen wurden dazu auf die gleiche Weise transfiziert, wie es in den entsprechenden Abschnitten beschrieben wurde.

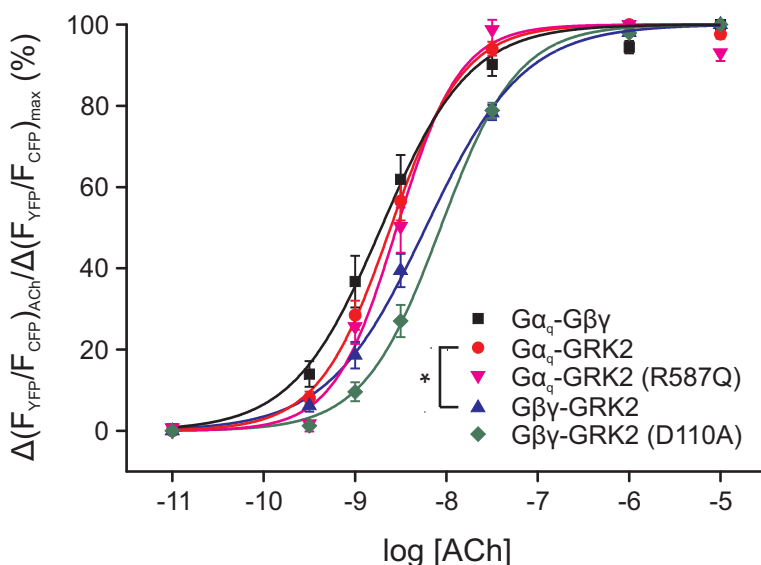


Abbildung 50: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Aktivierung des G_q -Proteins und der G_q -Protein-GRK2 Interaktion

HEK293T-Zellen, transfiziert wie zuvor bei den betreffenden FRET-Experimenten beschrieben, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Acetylcholin stimuliert bis die maximale agonistinduzierte FRET-Änderung erreicht wurde. Die absolute FRET-Änderung jeder Agonist-Konzentration wurde auf die FRET-Änderung der sättigenden Agonist-Konzentration normalisiert. Für jede Bedingung wurden die Daten der einzelnen Agonist-Konzentrationen gemittelt und graphisch dargestellt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 9$). Für die statistische Auswertung wurde der $\log(EC_{50})$ jeder Einzelmessung bestimmt und eine ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$) durchgeführt. Die Kurven der $G\alpha_q$ -GRK2 und der $G\beta\gamma$ -GRK2 Interaktion wurden bereits in Abbildung 36 gezeigt und sind hier zur besseren Vergleichbarkeit erneut dargestellt.

Wie Abbildung 50 zeigt, unterschieden sich die G-Protein-binderereduzierten GRK2-Mutanten in ihrer Interaktion mit der jeweils nicht betroffenen G-Protein-Untereinheit nicht signifikant vom Wildtyp. Die beiden Kurven der Wildtyp-GRK2 wurden bereits in Abbildung 36 gezeigt und sind hier zur besseren Vergleichbarkeit erneut dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\alpha_q$ - $G\beta\gamma$ -Interaktion war nicht signifikant unterschiedlich zur $G\alpha_q$ -GRK2-Interaktion, während sie zur Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\beta\gamma$ -GRK2-Interaktion signifikant linksverschoben war. Die Interaktion von $G\alpha_q$ mit der GRK2 spiegelt

dementsprechend die Aktivierung des G_q -Proteins wider. Die EC50-Werte dieser und der folgenden Experimente sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Der Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Interaktion der GRK2 oder der GRK2-Mutanten mit dem M_3 -AChR ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp-GRK2 und G_{α_q} -bindereduzierter GRK2 (D110A) (Abbildung 51). Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der $G\beta\gamma$ -bindereduzierten GRK2 (R587Q) war allerdings gegenüber der GRK2 (D110A) signifikant linksverschoben.

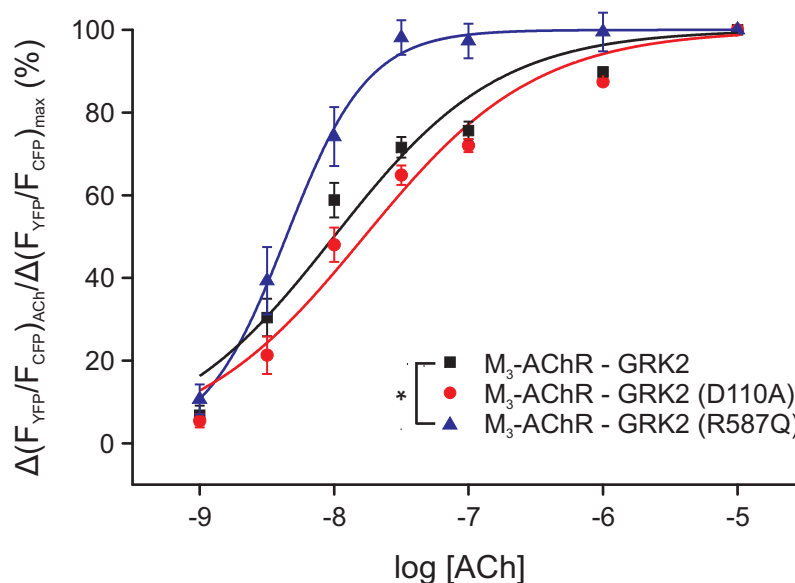


Abbildung 51: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Interaktion des M_3 -ACh-Rezeptors mit GRK2 oder den GRK2-Mutanten

HEK293T-Zellen, transfiziert wie zuvor beschrieben, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Acetylcholin stimuliert bis die maximale agonistinduzierte FRET-Änderung erreicht wurde. Die absolute FRET-Änderung jeder Agonist-Konzentration wurde auf die FRET-Änderung der sättigenden Agonist-Konzentration normalisiert. Für jede Bedingung wurden die Daten der einzelnen Agonist-Konzentrationen gemittelt ($MW \pm S.E.M.$; $n \geq 9$) und graphisch dargestellt.

Dieses Ergebnis spricht für eine verglichen zum Wildtyp etwas verbesserte Interaktion der $G\beta\gamma$ -bindereduzierten GRK2-Mutante mit dem Rezeptor. In Verbindung mit der in Abbildung 20 und in Abbildung 24 gezeigten verzögerten Dissoziation dieser GRK2-Mutante vom Rezeptor, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass der Rezeptor eine höhere Bindeaffinität zu GRK2 (R587Q) als zu Wildtyp-GRK2 besitzt. In Abhängigkeit von der Bindung von G_{α_q} und $G\beta\gamma$ an die GRK2 scheint die GRK2 also in unterschiedlichen Konformationen an den Rezeptor binden zu können. Wie bereits in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Interaktion von GRK2 mit dem Rezeptor gegenüber der

Aktivierung des G_q -Proteins signifikant rechtsverschoben, da ein gewisser Anteil aktivierter Rezeptoren zur maximalen G_q -Protein-Aktivierung bereits ausreichend ist (Rezeptorreserve).

Auch die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Interaktion von Arrestin mit dem Rezeptor und der Interaktion von $G\beta\gamma$ mit dem Rezeptor waren gegenüber der G_q -Protein-Aktivierung deutlich rechtsverschoben (Abbildung 52). Dieses Ergebnis hängt sehr wahrscheinlich auch wieder mit der Rezeptorreserve zusammen, so dass zur maximalen Aktivierung der Rezeptoren höhere Agonist-Konzentrationen erforderlich sind.

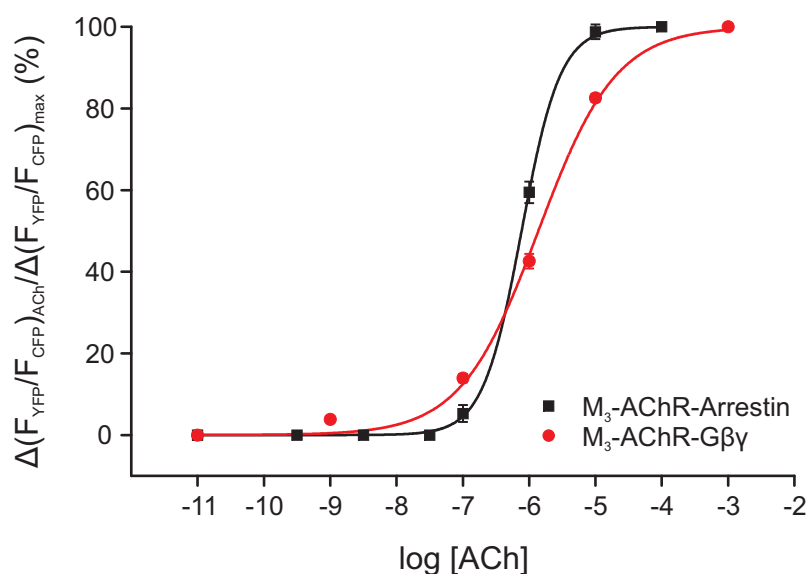


Abbildung 52: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Interaktion des M₃-ACh-Rezeptors mit G $\beta\gamma$ oder Arrestin3

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-YFP, Cer-G β_1 , unmarkiertem $G\alpha_q$, $G\gamma_2$ und pcDNA3 oder M₃-AChR-YFP, mTurq-Arrestin, unmarkiertem $G\alpha_q$, G β_1 , $G\gamma_2$ und GRK2, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Acetylcholin stimuliert bis die maximale agonistinduzierte FRET-Änderung erreicht wurde. Die absolute FRET-Änderung jeder Agonist-Konzentration wurde auf die FRET-Änderung der sättigenden Agonist-Konzentration normalisiert. Für jede Bedingung wurden die Daten der einzelnen Agonist-Konzentrationen gemittelt und graphisch dargestellt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 13$). Für die statistische Auswertung wurde der log (EC₅₀) jeder Einzelmessung bestimmt und eine ANOVA mit Bonferroni Posthoc-Test (*: $p < 0,05$) durchgeführt.

Tabelle 22: Auswertung der EC₅₀-Werte der in Abbildung 50, Abbildung 51 und Abbildung 52 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Interaktion	log (EC₅₀) [MW ± S.E.M.]	EC₅₀
Gα _q -Gβγ	-8,72 ± 0,11	1,93 nM ACh
Gα _q -GRK2	-8,60 ± 0,07	2,52 nM ACh
Gα _q -GRK2 (R587Q)	-8,51 ± 0,09	3,08 nM ACh
Gβγ-GRK2	-8,24 ± 0,08	5,82 nM ACh
Gβγ-GRK2 (D110A)	-8,10 ± 0,06	7,98 nM ACh
M ₃ -AChR-GRK2	-8,00 ± 0,10	10,01 nM ACh
M ₃ -AChR-GRK2 (D110A)	-7,78 ± 0,08	15,96 nM ACh
M ₃ -AChR-GRK2 (R587Q)	-8,34 ± 0,10	4,54 nM ACh
M ₃ -AChR-Arrestin	-6,11 ± 0,04	0,79 μM ACh
M ₃ -AChR-Gβγ	-5,86 ± 0,04	1,68 μM ACh

3.2.5 Kinetik der GRK2-Rekrutierung zum M₃-ACh-Rezeptor bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen

Um die Plausibilität der computerbasierten Simulation unter verschiedenen Bedingungen überprüfen zu können, ist die Kinetik der einzelnen Interaktionen bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden die Messdaten zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven zusätzlich kinetisch ausgewertet, um die benötigten Daten für die unterschiedlichen Acetylcholin-Konzentrationen zu erhalten.

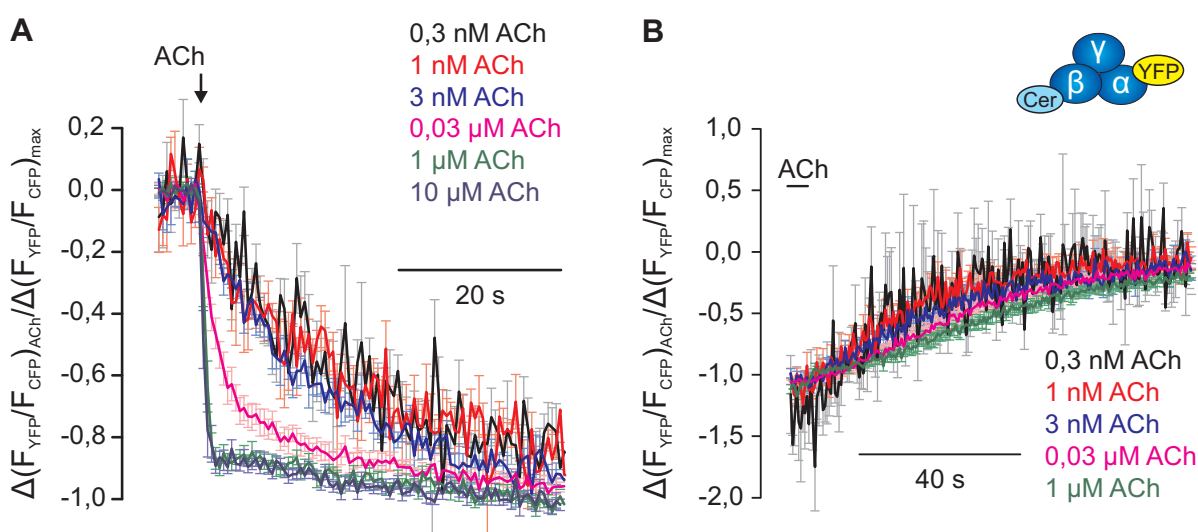


Abbildung 53: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen

HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$ und unmarkiertem M₃-AChR, $G\gamma_2$ und pcDNA3, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen und mit verschiedenen Agonist-Konzentrationen stimuliert. Zum Vergleich der „Onset“- und „Offset“-Kinetik wurden die FRET-Signale jeweils auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; n=10).

Der Einfluss der Agonist-Konzentration auf die Aktivierung und Deaktivierung des G_q -Proteins ist in Abbildung 53 dargestellt. Die Aktivierung der G_q -Proteine erfolgte bei niedrigen Agonist-Konzentrationen erwartungsgemäß nicht nur zu einem geringeren Ausmaß, wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, sondern auch mit deutlich langsamerer Kinetik. Dies ist dadurch zu erklären, dass nur wenige M₃-ACh-Rezeptoren aktiviert werden und die Aktivierung der G_q -Proteine deshalb langsamer erfolgt. Auf die Deaktivierung der G_q -Proteine haben die unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen dagegen kaum einen Einfluss, weil diese von der GTPase-Rate der $G\alpha_q$ -Untereinheit abhängig ist.

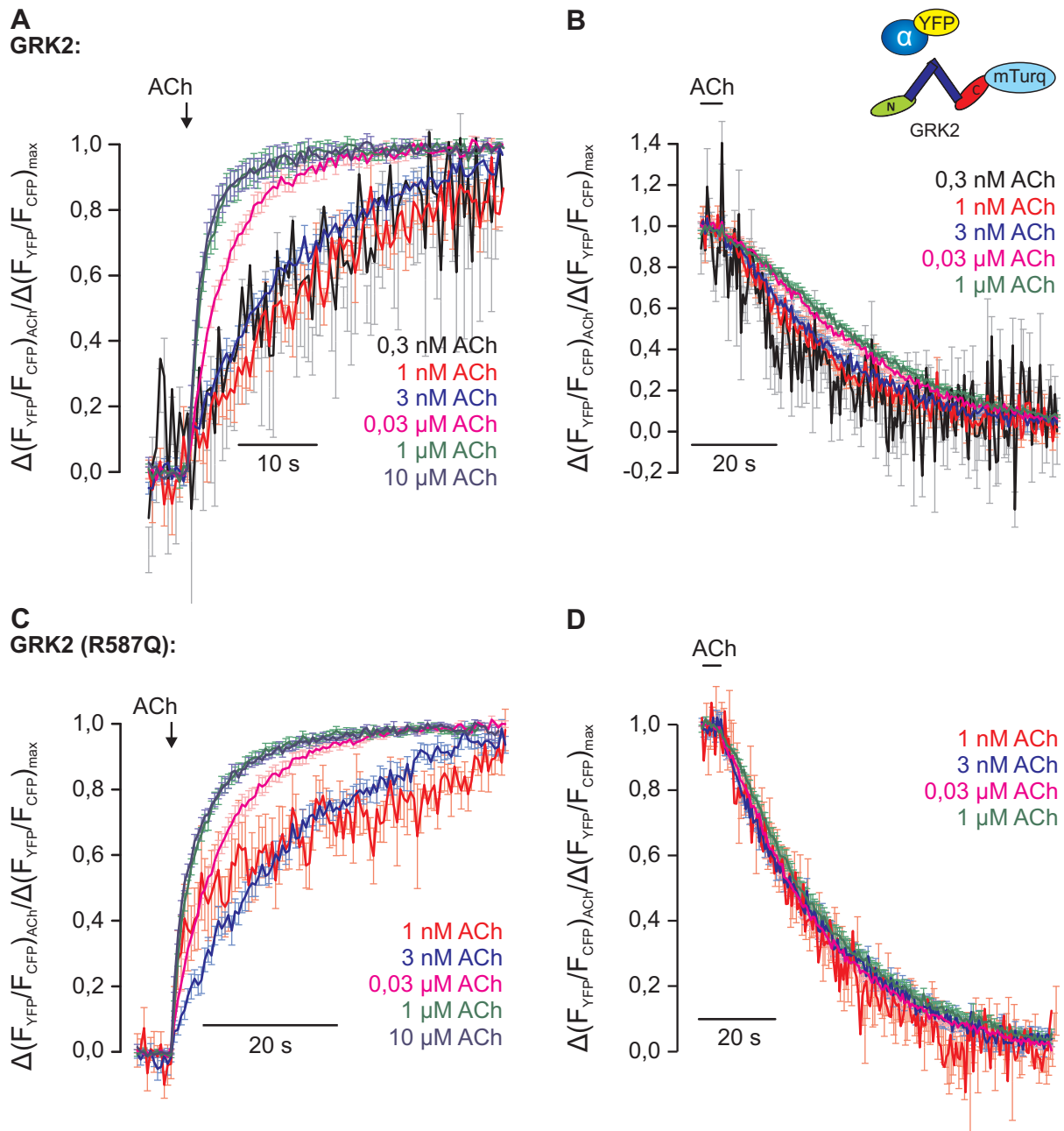


Abbildung 54: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen $G\alpha_q$ -YFP und GRK2-mTurq bzw. GRK2 (R587Q)-mTurq bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen

HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_q$ -YFP, GRK2-mTurq bzw. GRK2 (R587Q)-mTurq und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen und mit verschiedenen Agonist-Konzentrationen stimuliert. Zum Vergleich der „Onset“- und „Offset“-Kinetik wurden die FRET-Signale jeweils auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 9$).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Auswertung der Interaktionen zwischen $G\alpha_q$ und GRK2 (Abbildung 54), $G\beta\gamma$ und GRK2 (Abbildung 55), M_3 -AChR und GRK2 (Abbildung 56) und M_3 -AChR und $G\beta\gamma$ (Abbildung 57). In einigen Fällen, z.B. bei der M_3 -AChR- $G\beta\gamma$ -Interaktion, zeigte sich bei höheren Agonist-Konzentrationen eine

verlangsamte „Offset“-Kinetik (Abbildung 57B). Dieses Ergebnis ist unerwartet und sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Agonist beim Auswaschvorgang nicht schnell genug von der Zelle entfernt werden kann.

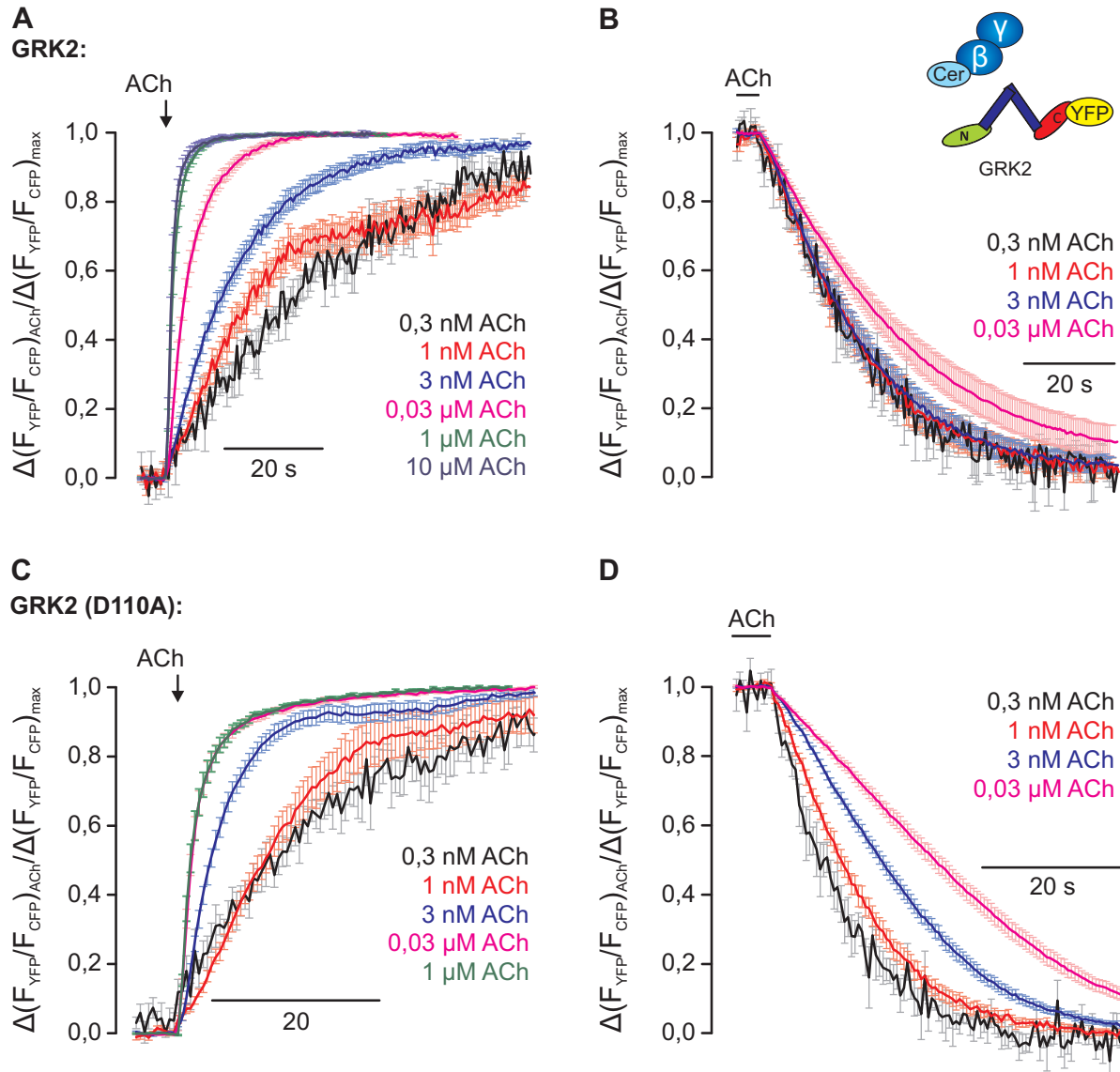


Abbildung 55: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Cer-Gβ₁ und GRK2-YFP bzw. GRK2 (D110A)-YFP bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen

HEK293T-Zellen, transfiziert mit Cer-Gβ₁, GRK2-YFP bzw. GRK2 (D110A)-YFP und unmarkiertem M₃-AChR, Gα_q und Gγ₂, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen und mit verschiedenen Agonist-Konzentrationen stimuliert. Zum Vergleich der „Onset“- und „Offset“-Kinetik wurden die FRET-Signale jeweils auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW ± S.E.M.; n≥9).

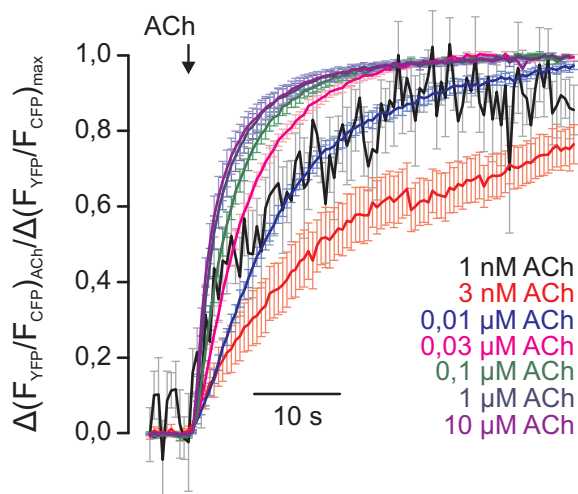
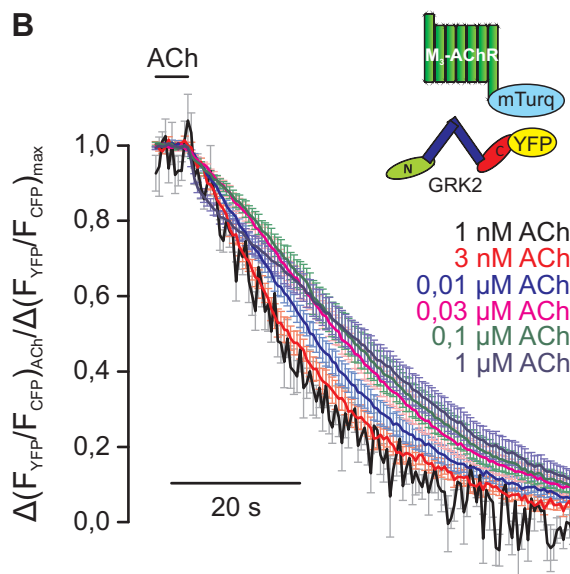
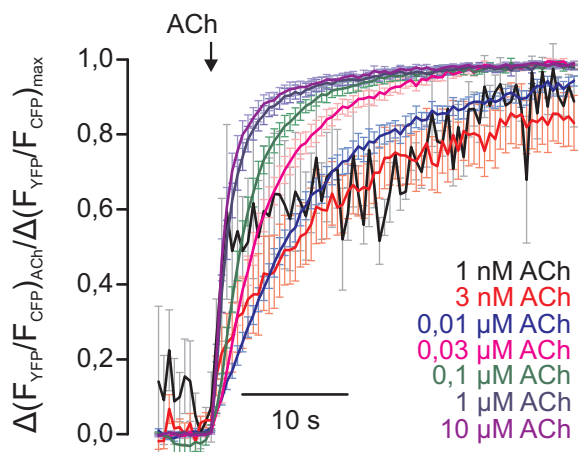
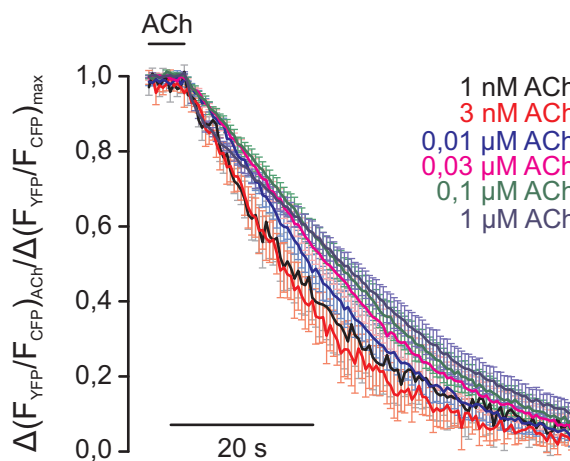
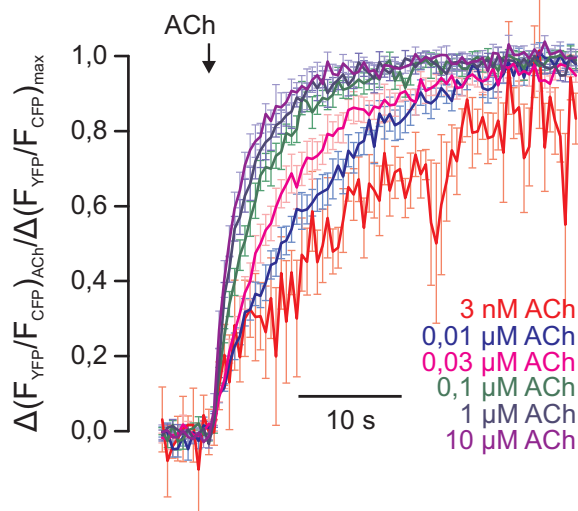
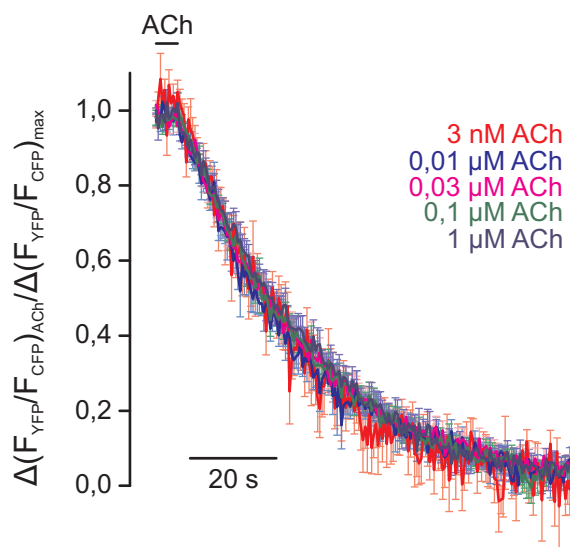
A
GRK2:**B****C**
GRK2 (D110A):**D****E**
GRK2 (R587Q):**F**

Abbildung 56, Bildunterschrift auf nächster Seite

Abbildung 56: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M₃-AChR-mTurq und YFP-markierter GRK2, GRK2 (D110A) oder GRK2 (R587Q) bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-mTurq, YFP-markierter GRK2, GRK2 (D110A) oder GRK2 (R587Q) und unmarkiertem G α_q , G β_1 und G γ_2 , wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen und mit verschiedenen Agonist-Konzentrationen stimuliert. Zum Vergleich der „Onset“- und „Offset“-Kinetik wurden die FRET-Signale jeweils auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; n \geq 9).

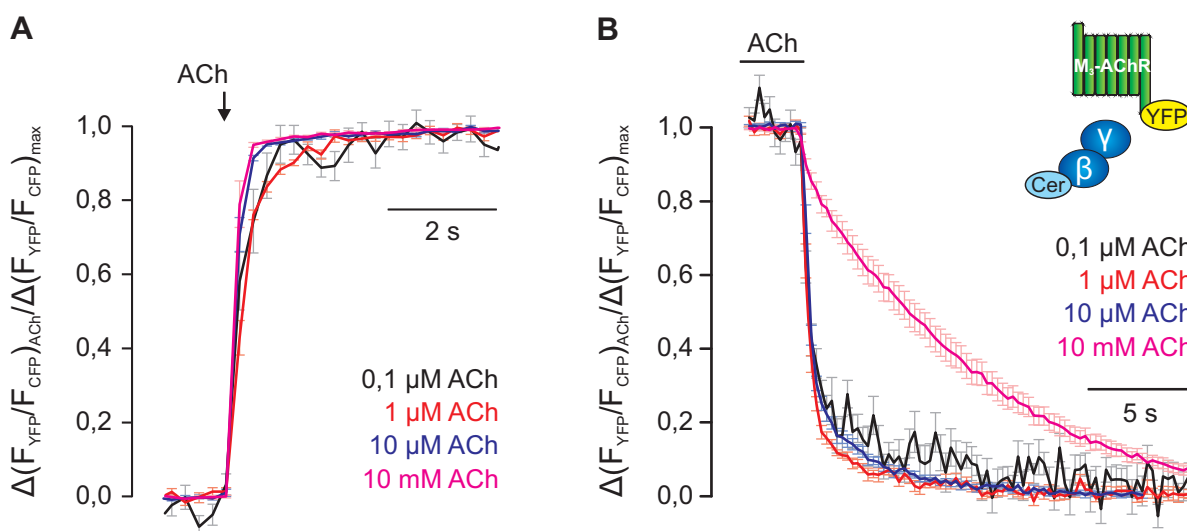


Abbildung 57: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M₃-AChR-YFP und Cer-G β_1 bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen

HEK293T-Zellen, transfiziert mit M₃-AChR-YFP, Cer-G β_1 und unmarkiertem G α_q , G γ_2 und pcDNA3, wurden FRET-Experimenten mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen und mit verschiedenen Agonist-Konzentrationen stimuliert. Zum Vergleich der „Onset“- und „Offset“-Kinetik wurden die FRET-Signale jeweils auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; n=14).

Zusammenfassend konnte im zweiten Teil dieser Arbeit durch FRET-Experimente detailliert die Kinetik der einzelnen an der GRK2-Rekrutierung zum M₃-ACh-Rezeptor beteiligten Schritte bei verschiedenen Agonist-Konzentrationen aufgeklärt werden. Zur Abschätzung der Sensitivität der Interaktionen wurden zusätzlich Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufgenommen. Ausgehend von den hier ermittelten Daten werden in Kooperation mit Dr. Dr. Leif Hommers vom Klinikum der Universität Würzburg die zugehörigen Reaktionskonstanten der einzelnen Schritte mit Hilfe der Software Virtual Cell (Moraru et al., 2008) simuliert. Das erstellte kinetische Modell soll zu einem besseren Verständnis der GRK2-Rekrutierung zu G $_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren beitragen.

3.3 Ergebnisanhang: Charakterisierung von $G\alpha_q$ (P185K)

Wie in Abschnitt 3.1.2.3 schon beschrieben, waren die Experimente mit der GRK2-bindedefizienten $G\alpha_q$ -Mutante, $G\alpha_q$ (P185K), nicht erfolgreich. $G\alpha_q$ (P185) wurde im M_3 -AChR-GRK2-Interaktions-Experiment mit dem Ziel eingesetzt, den Einfluss von $G\alpha_q$ auf die Interaktion zwischen M_3 -ACh-Rezeptor und GRK2 zu klären. Die Dissoziation von GRK2 vom M_3 -AChR war bei Überexpression von $G\alpha_q$ (P185K) im Vergleich zu Wildtyp- $G\alpha_q$ signifikant beschleunigt (Abbildung 27 und Abbildung 58A). Dies wurde zunächst als weiterer Hinweis darauf gedeutet, dass $G\alpha_q$ die Interaktionsstabilität zwischen GRK2 und dem M_3 -AChR erhöht.

$G\alpha_q$ (P185K) wurde in weiteren FRET-Experimenten genauer charakterisiert. Im M_3 -AChR-GRK2-Experiment wurde $G\alpha_q$ (P185K) mit GRK2 (R587Q) kombiniert. Verglichen mit der Kombination aus Wildtyp- $G\alpha_q$ und GRK2 (R587Q) sollte die GRK2-Bindedefizienz von $G\alpha_q$ (P185K) in einer Reduktion des FRET-Signals zum Ausdruck kommen. Wie in Abbildung 58B dargestellt ist, zeigten beide Bedingungen allerdings eine vergleichbare Amplitude des FRET-Signals, was darauf schließen lässt, dass die Mutante $G\alpha_q$ (P185K) immer noch in der Lage ist, mit GRK2 zu interagieren.

Diese Interaktion wurde deshalb anschließend in FRET-Experimenten zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ direkt untersucht (Abbildung 58D). Im Vergleich zur Kontrollbedingung mit Wildtyp- $G\alpha_q$ war das FRET-Signal mit $G\alpha_q$ (P185K) nicht reduziert, sondern, im Gegenteil, sogar vergrößert. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt wurde darin gesehen, dass die GRK2 durch die Interaktion mit $G\beta\gamma$ in die Nähe von $G\alpha_q$ gebracht wird. Um dies auszuschließen, wurde jeweils die $G\beta\gamma$ -bindedefiziente GRK2 (R587Q) cotransfiziert, die nicht in der Lage ist, $G\beta\gamma$ -vermittelt an die Membran zu translozieren. Aber auch in diesem Fall war mit $G\alpha_q$ (P185K) weiterhin ein FRET-Signal sichtbar, was die Hinweise auf eine verbleibende Interaktion mit GRK2 verstärkt. Zur Klärung der Frage nach dem Effekt von $G\alpha_q$ auf die GRK2- M_3 -AChR Interaktion kann die Mutante $G\alpha_q$ (P185K) dementsprechend nicht herangezogen werden.

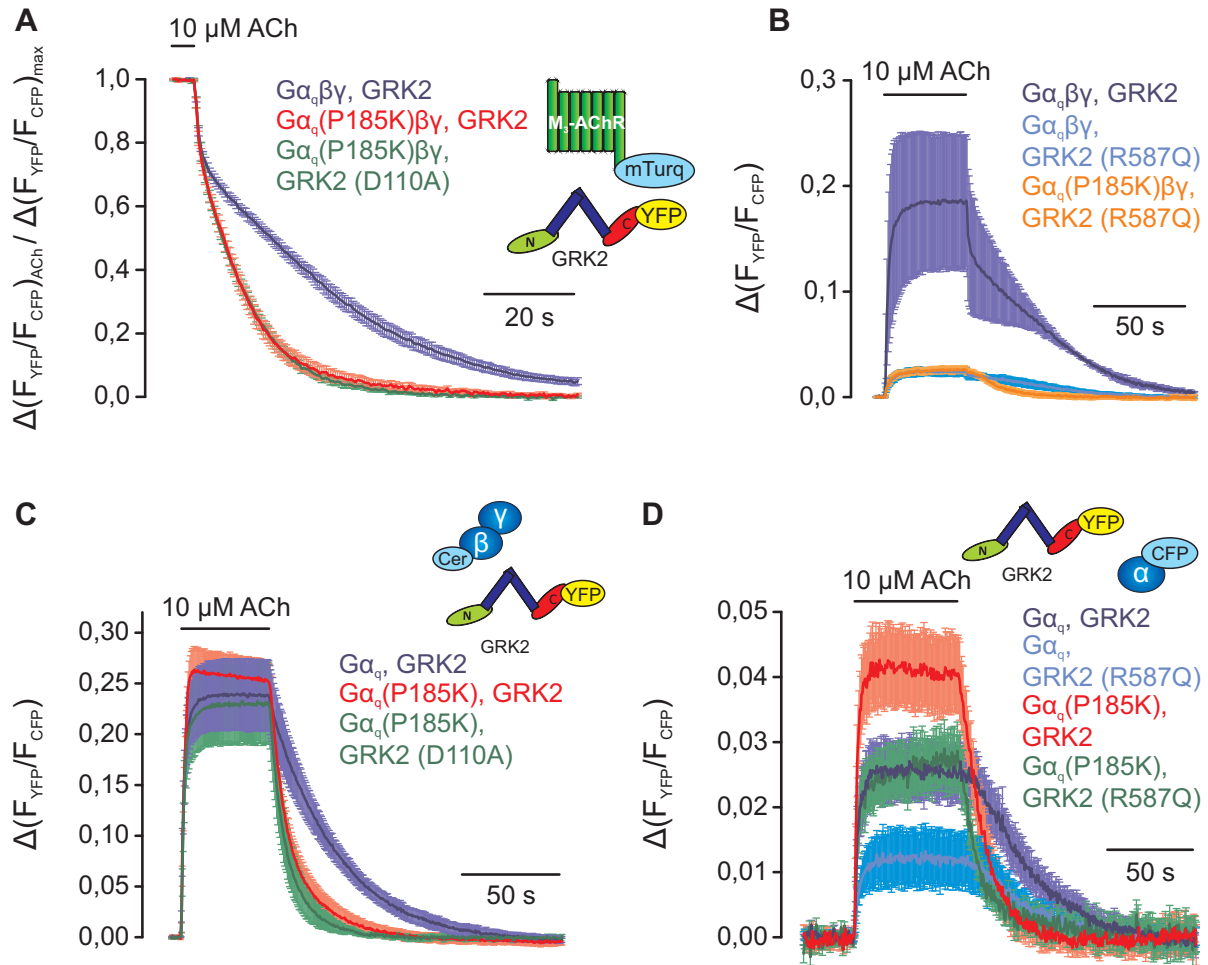


Abbildung 58: Eigenschaften von $G\alpha_q$ (P185K) im Vergleich zu Wildtyp- $G\alpha_q$ in verschiedenen FRET-Experimenten

(A) Zum Vergleich der „Offset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen Bedingungen des in Abbildung 27 dargestellten FRET-Experiments zwischen M_3 -AChR-mTurq und GRK2-YFP wurden die Einzelmessungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 11$). (B) HEK293T-Zellen, transfiziert mit M_3 -AChR-mTurq, YFP-markierter GRK2 oder GRK2 (R587Q), $G\beta_1$, $G\gamma_2$ und Wildtyp- $G\alpha_q$ oder $G\alpha_q$ (P185K), wurden mit einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n=6$, $n=2$ für Wildtyp-GRK2) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M_3 -AChR mit 10 µM Acetylcholin dargestellt. (C) HEK293T-Zellen, transfiziert mit Cer- $G\beta_1$, YFP-markierter GRK2 oder GRK2 (D110A) und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\gamma_2$ und Wildtyp- $G\alpha_q$ oder $G\alpha_q$ (P185K), wurden mit einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n=6$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M_3 -AChR mit 10 µM Acetylcholin dargestellt. (D) HEK293T-Zellen, transfiziert mit $G\alpha_q$ -CFP oder $G\alpha_q$ (P185K)-CFP, YFP-markierter GRK2 oder GRK2 (R587Q) und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\beta_1$ und $G\gamma_2$, wurden mit einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 4$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation des M_3 -AChR mit 10 µM Acetylcholin dargestellt.

Allerdings bleibt die Frage bestehen, wieso $G\alpha_q$ (P185K) die Dissoziations-Kinetik in den FRET-Experimenten zwischen M_3 -AChR und GRK2 (Abbildung 58A), sowie auch zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ (Abbildung 58D) und zwischen GRK2 und $G\beta\gamma$ (Abbildung 58C) beschleunigt. Um dies zu klären, wurde die Deaktivierung des G-Proteins im FRET-Experiment zwischen $G\alpha_q$ (P185K) und $G\beta\gamma$ untersucht (Abbildung 59).

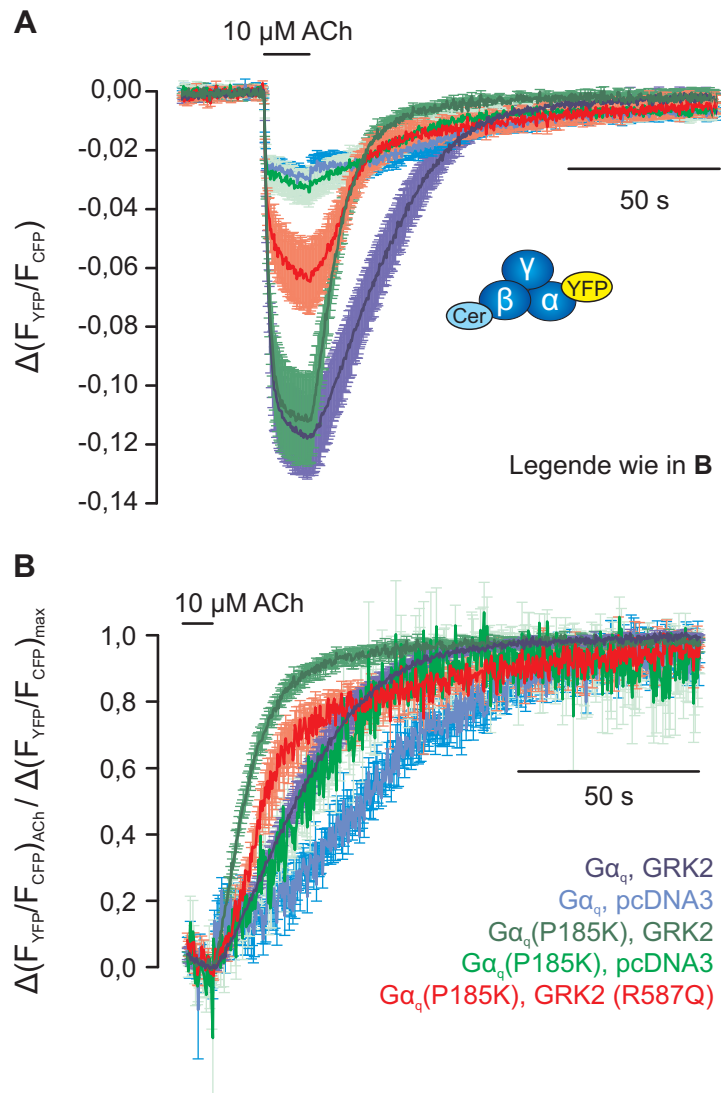


Abbildung 59: Charakterisierung von $G\alpha_q$ (P185K) im Vergleich zum Wildtyp im FRET-Experiment zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$

HEK293T-Zellen, transfiziert mit YFP-markiertem $G\alpha_q$ oder $G\alpha_q$ (P185K), Cer- $G\beta_1$ und unmarkiertem M_3 -AChR, $G\gamma_2$ und GRK2, GRK2 (R587Q) oder pcDNA3, wurden einer FRET-Messung mit einer Frequenz von 2 Hz unterzogen. (A) Die Einzelmessungen jeder Bedingung wurden gemittelt (MW \pm S.E.M.; $n \geq 4$) und die absolute FRET-Änderung nach Stimulation mit 10 μ M Acetylcholin dargestellt. (B) Zum Vergleich der „Offset“-Kinetik des FRET-Signals wurden die Einzelmessungen der unterschiedlichen Bedingungen auf ihre individuelle FRET-Änderung normalisiert und gemittelt.

Im Vergleich zu den Bedingungen mit Wildtyp- $G\alpha_q$ hat die Anwesenheit von $G\alpha_q$ (P185K) keinen signifikanten Einfluss auf die Amplituden der erhaltenen FRET-Signale. Allerdings lässt sich auch hier wieder ein Effekt auf die Dissoziations-Kinetik feststellen. Insbesondere in Anwesenheit von GRK2 beschleunigt $G\alpha_q$ (P185K) die „Offset“-Kinetik. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, dass $G\alpha_q$ (P185K) immer noch an die GRK2 bindet, allerdings auf eine andere Weise als Wildtyp- $G\alpha_q$, und dass dadurch eine bisher nicht dokumentierte GAP-Funktion der GRK2 ausgelöst wird.

4 Diskussion

Schon vor 28 Jahren wurde die GRK2 über ihre Fähigkeit, β -adrenerge Rezeptoren zu phosphorylieren, entdeckt und zunächst als β ARK bezeichnet (Benovic et al., 1986). Seitdem wurde die GRK2 intensiv erforscht und zahlreiche weitere Funktionen und Interaktionspartner identifiziert. Da sich schnell herausstellte, dass die GRK2 nicht nur mit β -adrenergen Rezeptoren, sondern allgemein mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagiert, wurde sie in G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 umbenannt (Palczewski und Benovic, 1991). Gleichzeitig wurden weitere Kinasen mit ähnlicher Funktion gefunden, die der gleichen Gruppe zugeordnet wurden (Lorenz et al., 1991). Inzwischen ist die Desensibilisierung aktivierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch die GRK2 im Zusammenspiel mit Arrestin intensiv erforscht (Lefkowitz et al., 1990; Lohse et al., 1990; Krasel et al., 2005), genauso wie wichtige Mechanismen, die dafür sorgen, dass die zytosolisch lokalisierte GRK2 an die Membran transloziert und mit aktivierten Rezeptoren interagiert. Dazu gehört die Interaktion der GRK2 mit freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und negativ geladenen Phospholipiden der Membran. Diese Interaktionen wurden zunächst über “pull-down”-Experimente, Mutationsanalysen und die Messung der Rezeptorphosphorylierung aufgeklärt (Haga und Haga, 1992; Pitcher et al., 1992; Koch et al., 1993; Touhara et al., 1995; Onorato et al., 1995; DebBurman et al., 1996). Die Interaktion der GRK2 mit $G\beta\gamma$ wurde anschließend auch durch eine Kristallstruktur gezeigt (Lodowski, 2003). Als weiterer Interaktionspartner der GRK2 wurde über “pull-down”-Experimente die $G\alpha_q$ -Untereinheit des G-Proteins identifiziert (Carman et al., 1999b; Sallese et al., 2000). Eine Kristallstruktur konnte zeigen, dass sogar die simultane Interaktion von GRK2, $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ möglich ist (Tesmer et al., 2005). Die Bindung von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ an die GRK2 hemmt die Weiterleitung des Rezeptorsignals an Effektoren von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ und wird als phosphorylierungsunabhängige Desensibilisierung des Rezeptors bezeichnet (Sallese et al., 2000; Luo et al., 2008; Fernandez et al., 2011).

Bisher war allerdings weniger darüber bekannt, welche weiteren Funktionen die Interaktion der GRK2 mit $G\alpha_q$ besitzt. Auch eine detaillierte kinetische Beschreibung der agonistabhängigen Rekrutierung der GRK2 zu aktivierten G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren fehlte bisher. Bezüglich der Interaktionskinetik der GRK2 mit $G\beta\gamma$ oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gab es einzelne Studien, die dies mit Hilfe des Biolumineszenz-

Resonanzenergietransfers (BRET) untersucht haben (Breton et al., 2010; Hasbi et al., 2004). Diese Methode ist allerdings in ihrer zeitlichen Auflösung limitiert und bietet nicht die Möglichkeit, die Dissoziation zu untersuchen. Um in diesem Bereich neue Erkenntnisse zu liefern, wurde in dieser Arbeit die Methode des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) angewendet. Die durchgeführten dynamischen FRET-Experimente erlaubten es, die für die Rekrutierung der GRK2 zum Rezeptor wichtigen Protein-Interaktionen in Echtzeit in lebenden Einzelzellen zu verfolgen. Durch die hohe zeitliche Auflösung der FRET-Experimente konnte die Kinetik der agonistvermittelten Interaktionen zuverlässig bestimmt werden. Eine besondere Stärke der Versuche lag in der Möglichkeit, die Dissoziation der Interaktionspartner nach Auswaschen des Agonisten untersuchen zu können. Auf die Ermittlung der entsprechenden kinetischen Daten wurde daher besonderes Augenmerk gelegt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von $G\alpha_q$ auf die agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zu G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren und auf die Funktion der GRK2 untersucht. Aus diesem Grund wurden erstmalig FRET-basierte Experimente etabliert, mit deren Hilfe die Interaktion der GRK2 mit dem M_3 -ACh-Rezeptor sowie mit $G\alpha_q$ oder $G\beta\gamma$ in lebenden Einzelzellen sichtbar gemacht werden konnten. Zu den wichtigsten Ergebnissen dieser Experimente gehört, dass $G\alpha_q$ genauso wie $G\beta\gamma$ zur Translokation der GRK2 an die Membran beiträgt, dass $G\alpha_q$ sowohl das Ausmaß als auch die Stabilität der Interaktion zwischen der GRK2 und dem M_3 -ACh-Rezeptor erhöht und dass $G\alpha_q$ die Funktion der GRK2 verstärkt. Zudem ermöglichten diese Experimente eine genaue kinetische Analyse dieser Interaktionen. In Verbindung mit weiteren durchgeführten FRET-Experimenten konnte eine detaillierte kinetische Beschreibung der Rekrutierung der GRK2 zum Rezeptor, beginnend bei der Interaktion inaktiver G_q -Proteine mit aktivierten M_3 -ACh-Rezeptoren bis hin zur Bildung eines Komplexes aus GRK2, $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ am Rezeptor, erstellt werden. Die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Erstellung eines computerbasierten Modells der GRK2-Rekrutierung genutzt werden, das einerseits zur Plausibilitätsprüfung der beschriebenen Vorgänge dienen und andererseits Reaktionskonstanten für die unterschiedlichen einbezogenen Assoziationen und Dissoziationen liefern soll. Die Erstellung dieser Simulation mit Hilfe der Software Virtual Cell (Moraru et al., 2008) erfolgt in Kooperation mit Dr. Dr. Leif Hommers vom Klinikum der Universität Würzburg und ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.

4.1 Einfluss von $G\alpha_q$ auf die agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -ACh-Rezeptor

Zur Untersuchung des Einflusses von $G\alpha_q$ auf die agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zu G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden in dieser Arbeit FRET-basierte Experimente zwischen GRK2 und dem M_3 -ACh-Rezeptor sowie zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ oder $G\beta\gamma$ etabliert, mit deren Hilfe die dynamische Interaktion der GRK2 mit dem M_3 -ACh-Rezeptor oder den G_q -Protein-Untereinheiten zum ersten Mal in Echtzeit sichtbar gemacht werden konnten.

Zur Durchführung der FRET-Messungen wurde ein C-Terminal fluoreszenzmarkiertes GRK2-Konstrukt verwendet. Hierbei ist es wichtig sicherzustellen, dass die Funktionalität der GRK2 durch das eingefügte Fluoreszenzprotein nicht beeinträchtigt wird. Im Fall der fluoreszenzmarkierten GRK2 konnte durch Jörg Brockmann eine vergleichbare Phosphorylierung von Rhodopsin durch die fluoreszenzmarkierte GRK2 und den Wildtyp gezeigt werden (Brockmann, 2005; Wolters et al., 2014). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte angenommen werden, dass die fluoreszenzmarkierten Konstrukte uneingeschränkt funktional sind. Für die Beurteilung von FRET-Experimenten spielt außerdem eine wichtige Rolle, wie spezifisch die Messung die untersuchte Interaktion widerspiegelt. Eine Ursache für eine eingeschränkte Spezifität wäre, dass die beiden FRET-Partner sich zufällig in relativer Nähe zueinander befinden, wodurch ein FRET-Signal trotz fehlender direkter Interaktion zustande kommen kann. Um dies auszuschließen, wurden im Fall der Interaktion zwischen GRK2 und dem M_3 -AChR HEK293T-Zellen mit den gleichen FRET-Partnern, aber zusätzlich unmarkiertem α_{2A} -adrenergem Rezeptor (α_{2A} -AR) und G_i -Proteinen transfiziert. Die Stimulation der α_{2A} -AR führte zur Translokation der GRK2 an die Membran, allerdings zu den α_{2A} -AR anstelle der M_3 -ACh-Rezeptoren (Abbildung 18B). In diesem Fall konnte nur ein äußerst geringes unspezifisches FRET-Signal registriert werden (Abbildung 18A), was die hohe Spezifität der FRET-Messung zwischen GRK2 und M_3 -AChR verifiziert. Auf ähnliche Weise wurde die Spezifität der FRET-Messung zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ bestätigt, indem das FRET-Signal zwischen GRK2 und $G\alpha_i$ untersucht wurde. Genau wie $G\alpha_q$, ist $G\alpha_i$ an der Membran lokalisiert, aber nicht in der Lage, mit der GRK2 zu interagieren (Carman et al., 1999b), so dass auch hier nur ein sehr geringer FRET-Anstieg zu verzeichnen war (Abbildung 33D).

Um den Einfluss der G-Protein-Bindung auf die GRK2-Rekrutierung zu untersuchen, wurden Mutanten der GRK2 eingesetzt, die jeweils eine reduzierte Bindeaffinität zu $G\beta\gamma$ (Carman et al., 2000) oder $G\alpha_q$ (Sterne-Marr et al., 2003) besitzen. Zudem wurde eine dominant-negative GRK2-Mutante verwendet, um phosphorylierungsabhängige Effekte zu kontrollieren (Kong et al., 1994). Für die Beurteilung der mit diesen Konstrukten erzielten Ergebnisse ist die Effektivität der verwendeten bindereduzierten GRK2-Mutanten von entscheidender Bedeutung. Die eingeführten Mutationen waren bereits in den oben genannten Publikationen beschrieben worden. Da die Effekte der Mutationen in diesen Studien allerdings zumeist über Methoden, wie “pull-down”-Experimente, charakterisiert worden waren, wurden diese Ergebnisse in dieser Arbeit mit Hilfe von FRET-Experimenten überprüft. Im Gegensatz zur Wildtyp-GRK2 war zwischen der $G\beta\gamma$ -bindereduzierten GRK2-Mutante und $G\beta\gamma$ nur eine minimale agonistvermittelte FRET-Änderung messbar (Abbildung 32A). Auch das FRET-Signal zwischen der $G\alpha_q$ -bindereduzierten GRK2-Mutante und $G\alpha_q$ war verglichen zum Wildtyp deutlich reduziert (Abbildung 33A). Die Effektivität dieser Mutante war allerdings mit einer verbleibenden Interaktion von etwa 30% nicht so deutlich ausgeprägt, wie bei der $G\beta\gamma$ -bindereduzierten Mutante. Durch die hier durchgeführte Interaktionsstudie in lebenden Zellen können schwache Interaktionen wahrscheinlich sensitiver detektiert werden als in “pull-down”-Experimenten, weshalb die verbleibende Bindung dieser Mutante bisher nicht beschrieben wurde.

Zur Auswertung der FRET-Experimente wurden die Amplituden der FRET-Signale der unterschiedlichen GRK2-Mutanten verglichen und als Maß für die Interaktion zwischen den jeweiligen FRET-Partner verwendet. Diese Interpretation ist allerdings nur möglich, wenn Distanz und Orientierung der Fluorophore im FRET-Experiment durch die eingefügten Mutationen nicht wesentlich verändert werden. Andernfalls sind schon durch die eingefügten Mutationen selbst, Änderungen im FRET-Signal zu erwarten. Da die jeweiligen GRK2-Mutanten jedoch nur durch einzelne Punktmutationen erzeugt wurden, ist es als eher unwahrscheinlich einzuschätzen, dass größere Änderungen in der Proteinfaltung sowie der Interaktion der GRK2-Mutanten mit dem Rezeptor oder der jeweiligen nicht betroffenen G-Protein-Untereinheit hervorgerufen werden. Eine weitere Voraussetzung dafür, dass Amplitudenunterschiede im FRET-Signal mit Unterschieden im Ausmaß der Interaktion gleichgesetzt werden können, ist, dass das relative Expressionsverhältnis der beiden fluoreszenzmarkierten Proteine in allen Bedingungen annähernd gleich ist. Wie in Abschnitt

3.1.2.1 bereits beschrieben, können Änderungen im relativen Expressionsverhältnis der FRET-Partner die Amplitude des FRET-Signals beeinflussen. Insbesondere wenn ein Überschuss des CFP-markierten Proteins vorliegt, kann dies die Amplitude des FRET-Signals deutlich reduzieren. Um sicherzustellen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen FRET-Experimente nicht durch Unterschiede im Expressionslevel beeinflusst wurden, wurde das relative Expressionsverhältnis in jeder einzelnen Messung bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit der Bedingungen zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass zwischen den Bedingungen keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel bestanden oder zumindest ein Überschuss des YFP-markierten Proteins vorhanden war. Sofern die GRK2 nicht in fluoreszenzmarkierte Form vorlag, wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analysen bestätigt, dass die GRK2 und die unterschiedlichen GRK2-Mutanten gleich stark exprimiert waren.

Bisher war man davon ausgegangen, dass die Interaktion der GRK2 mit freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und mit negativ geladenen Phospholipiden für die Membrantranslokation verantwortlich ist (Pitcher et al., 1992; Touhara et al., 1995). Zu den wichtigsten Ergebnissen dieser Arbeit gehört, dass auch $G\alpha_q$ in der Lage ist, die GRK2 agonistabhängig an die Membran zu rekrutieren. Zudem erhöht $G\alpha_q$ sowohl das Ausmaß als auch die Stabilität der Interaktion zwischen der GRK2 und dem M_3 -ACh-Rezeptor und ist für die Kinasefunktion der GRK2 von Bedeutung. Ein wichtiger Beweis dafür, dass nicht nur $G\beta\gamma$, sondern auch $G\alpha_q$, die GRK2 agonistabhängig an die Membran rekrutiert, war das signifikant vergrößerte FRET-Signal zwischen M_3 -AChR und der $G\beta\gamma$ -binderreduzierten GRK2-Mutante im Vergleich zur GRK2-Doppelmutante, deren Interaktion mit $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ reduziert ist (Abbildung 23). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Interaktion mit $G\alpha_q$ alleine eine Translokation der GRK2 an die Membran bewirkt und dadurch eine Interaktion der GRK2 mit dem Rezeptor ermöglicht. Bestätigt wurde dies durch konfokalmikroskopische Untersuchungen der Translokation der GRK2 in lebenden Zellen. Die $G\beta\gamma$ -binderreduzierte GRK2-Mutante zeigte in diesen Experimenten immer noch eine deutliche agonistabhängige Translokation an die Membran, während die GRK2-Doppelmutante auch nach Agonist-Stimulation weiterhin zytosolisch lokalisiert war (Abbildung 28). Zudem konnte ein beträchtliches agonistvermitteltes FRET-Signal zwischen der $G\beta\gamma$ -binderreduzierten GRK2 und der $G\alpha_q$ -Untereinheit gemessen werden, die üblicherweise in der Membran lokalisiert ist (Abbildung 33A).

Die Beteiligung von $G\alpha_q$ an der Membrantranslokation der GRK2 ist ein neuer Aspekt in der Rekrutierung der GRK2 zu aktivierten G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren, der in dieser Arbeit erstmalig beschrieben werden konnte. Gleichzeitig machen die Experimente aber auch deutlich, dass $G\beta\gamma$ verglichen zu $G\alpha_q$ die größere Rolle bei der Rekrutierung der GRK2 spielt. Dies zeigte sich einerseits darin, dass die GRK2 schneller mit $G\beta\gamma$ als mit $G\alpha_q$ interagiert (Abbildung 34A), andererseits darin, dass die $G\alpha_q$ -bindereduzierte Mutante stärker mit dem Rezeptor interagiert als die $G\beta\gamma$ -bindereduzierte Mutante (Abbildung 23).

Die Bindung von $G\alpha_q$ an die GRK2 verstärkt außerdem signifikant das Ausmaß und die Stabilität der Interaktion der GRK2 mit dem M_3 -AChR, so dass in Anwesenheit von $G\alpha_q$ eine vergleichsweise langsame Dissoziation der GRK2 vom M_3 -ACh-Rezeptor messbar ist (Abbildung 24B). Der Effekt von $G\alpha_q$ auf das Ausmaß der Interaktion konnte durch das signifikant reduzierte FRET-Signal zwischen M_3 -ACh-Rezeptor und $G\alpha_q$ -bindereduzierter GRK2 im Vergleich zur Wildtyp-GRK2 nachgewiesen werden (Abbildung 23). Der Einfluss auf die Stabilität der Interaktion zwischen GRK2 und M_3 -AChR zeigte sich durch die in Abwesenheit von $G\alpha_q$ beschleunigte Dissoziation der GRK2 vom Rezeptor nach Auswaschen des Agonisten (Abbildung 26). In diesem Zusammenhang wäre zu erwarten, dass auch die $G\alpha_q$ -bindedefiziente GRK2-Mutante schneller vom Rezeptor dissoziiert als der Wildtyp. Dies war allerdings nicht der Fall, was wahrscheinlich dadurch zu erklären ist, dass die Mutation die Bindung von $G\alpha_q$ nicht vollständig aufhebt, sondern nur zu etwa 70% reduziert. Besonders bei der in diesem Experiment vorliegenden hohen Expression der GRK2-Varianten könnte die verbliebene Affinität zu $G\alpha_q$ dazu führen, dass immer noch eine relativ langsame „Offset“-Kinetik auftritt. Als weiterer Befund zeigte sich eine signifikant beschleunigte „Offset“-Kinetik zwischen $G\beta\gamma$ und der $G\alpha_q$ -bindereduzierten GRK2-Mutante verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 34B), was darauf hinweist, dass $G\alpha_q$ die Stabilität der Interaktion zwischen GRK2 und $G\beta\gamma$ erhöht. Gemeinsam mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen legt dies die Vermutung nahe, dass agonistabhängig ein stabiler Komplex aus GRK2 und G-Protein am Rezeptor gebildet wird, der nach Auswaschen des Agonisten erst langsam dissoziiert.

Darüber hinaus zeigte die verglichen mit $G\beta\gamma$ verzögerte Dissoziation von $G\alpha_q$ und GRK2 (Abbildung 34B) sowie die signifikant höhere Sensitivität der GRK2- $G\alpha_q$ -Interaktion im Vergleich zur GRK2- $G\beta\gamma$ -Interaktion (Abbildung 36), dass die GRK2 eine höhere

Bindeaffinität zu $G\alpha_q$, als zu $G\beta\gamma$ besitzt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass $G\alpha_q$ bei niedrigen Agonist-Konzentrationen eine größere Bedeutung bei der Rekrutierung der GRK2 besitzt.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass $G\alpha_q$ auch die Kinaseaktivität der GRK2 verstärkt. Zur Abschätzung des Einflusses von $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ auf die Kinasefunktion der GRK2 wurde die Rekrutierung von Arrestin3 zum M_3 -AChR gemessen. Die Arrestinbindung kann zur Untersuchung der Funktionalität der unterschiedlichen GRK2-Mutanten herangezogen werden, da eine gleichzeitige Rezeptoraktivierung und Rezeptorphosphorylierung durch GRKs für die Bindung von Arrestin an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erforderlich ist (Krasel et al., 2005). Unterschiede in der Rezeptorphosphorylierung spiegeln sich in der Arrestinbindung wider und beeinflussen entsprechend das FRET-Signal. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bindung von $G\beta\gamma$ an die GRK2 notwendig ist, um eine Rezeptorphosphorylierung zu ermöglichen (Abbildung 38A). Dies wird sehr wahrscheinlich dadurch verursacht, dass $G\beta\gamma$ die GRK2 in eine zur Phosphorylierung des Rezeptors geeignete Orientierung bringt, wie dies bereits in früheren Studien vermutet wurde (Wu et al., 1998). In Anwesenheit von $G\alpha_q$ -binderreduzierter GRK2 zeigte sich in der Tendenz eine stärkere Arrestinbindung an den Rezeptor als in Abwesenheit von GRK2, dennoch war eine effiziente Rekrutierung von Arrestin zum M_3 -AChR nur bei gleichzeitiger Bindung von $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ möglich (Abbildung 38A). Dies deutet darauf hin, dass $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ gemeinsam die GRK2 so zum Rezeptor positionieren, dass eine optimale Phosphorylierung ermöglicht wird.

Die durch $G\alpha_q$ verstärkte Translokation der GRK2 an die Membran besitzt keinen Einfluss auf die Interaktion der GRK2 mit G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren (Abbildung 39). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der Einfluss von $G\alpha_q$ auf die GRK2 Rekrutierung auf G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren beschränkt ist.

4.2 Kinetische Beschreibung der Rekrutierung der GRK2 zum M₃-AChR

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten FRET-Experimente konnte die Kinetik der einzelnen Vorgänge, die an der agonistabhängigen Rekrutierung der GRK2 zum M₃-ACh-Rezeptor beteiligt sind, detailliert aufgelöst werden, beginnend mit der Interaktion inaktiver G_q-Proteine mit dem Rezeptor bis zur Bildung des Komplexes aus Rezeptor, G-Protein und GRK2. Zusätzlich konnte erstmals auch die Dissoziation dieses Komplexes nach Auswaschen des Agonisten analysiert werden.

Die Rekrutierung der GRK2 wird durch Stimulation des Rezeptors und nachfolgende Bindung inaktiver G-Proteine an den Rezeptor ausgelöst. Die G_q-Protein-Bindung an den M₃-ACh-Rezeptor erfolgte mit einer Halbwertszeit von 0,11 s (Abbildung 41). Ähnlich schnell folgte darauf die Aktivierung des G-Proteins mit einer Halbwertszeit von 0,14 s (Abbildung 48A). Die hier gefundenen Zeitkonstanten sind vergleichbar mit Ergebnissen für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Bünemann et al., 2003; Hein et al., 2006; Lohse et al., 2012). Die Aktivierung des G_q-Proteins ist die Voraussetzung für die nachfolgende Bindung von G α_q und G $\beta\gamma$ an die GRK2, die dadurch an die Membran rekrutiert wird. Die Interaktion der GRK2 mit G $\beta\gamma$ erfolgte dabei mit einer Halbwertszeit von 0,95 s (Abbildung 34A). Die Bindung von G α_q ist mit einer Halbwertszeit von 3,34 s etwa dreimal langsamer (Abbildung 34A). Die Rezeptorinteraktion der GRK2 erfolgte bereits kurz nach der Bindung von G $\beta\gamma$ ($t_{1/2} = 1,44$ s) (Abbildung 24A). Das FRET-Signal zwischen Rezeptor und G $\beta\gamma$ unterschied sich dabei nicht wesentlich in Anwesenheit oder Abwesenheit von GRK2 (Abbildung 40A). Dies deutet darauf hin, dass die Orientierung zwischen Rezeptor und G $\beta\gamma$ nur wenig dadurch beeinflusst wird, ob G $\beta\gamma$ im inaktiven G-Protein oder im Komplex mit GRK2 mit dem Rezeptor interagiert, wie dies bereits in früheren Studien postuliert wurde (Boughton et al., 2011).

Die Interaktion mit G $\beta\gamma$ ist von entscheidender Bedeutung für die Kinetik der Interaktion zwischen Wildtyp-GRK2 und Rezeptor. Wenn die Interaktion mit G $\beta\gamma$ nicht möglich ist, wie im Fall der G $\beta\gamma$ -bindereduzierten GRK2-Mutante, wirkt sich dies deutlich auf die Kinetik aus. Die Rezeptorinteraktion war in diesem Fall mit einer Halbwertszeit von 2,39 s deutlich verzögert (Abbildung 24A) und nicht signifikant unterschiedlich zur Bindung dieser Mutante an G α_q (Abbildung 34A). Dies weist darauf hin, dass die Membrantranslokation der GRK2 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Interaktion zwischen GRK2 und Rezeptor

ist. Dass die $G\beta\gamma$ -bindereduzierte Mutante langsamer zum Rezeptor rekrutiert wird, wurde indirekt auch durch die FRET-Experimente zwischen Rezeptor und $G\beta\gamma$ bestätigt. Bei diesen Experimenten zeigte sich eine zweite Komponente während der Stimulation, die zu einem Abfall im FRET Ratio führte (Abbildung 40A). Kinetisch stimmt diese Komponente mit der Rekrutierung der $G\beta\gamma$ -bindereduzierten GRK2-Mutante durch $G\alpha_q$ überein und kann dadurch erklärt werden, dass $G\beta\gamma$ durch den GRK2- $G\alpha_q$ -Komplex vom Rezeptor verdrängt wird.

Durch die Ergebnisse der durchgeführten FRET-Experimente lässt sich das folgende Reaktionsschema der Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -AChR aufstellen (Abbildung 60).

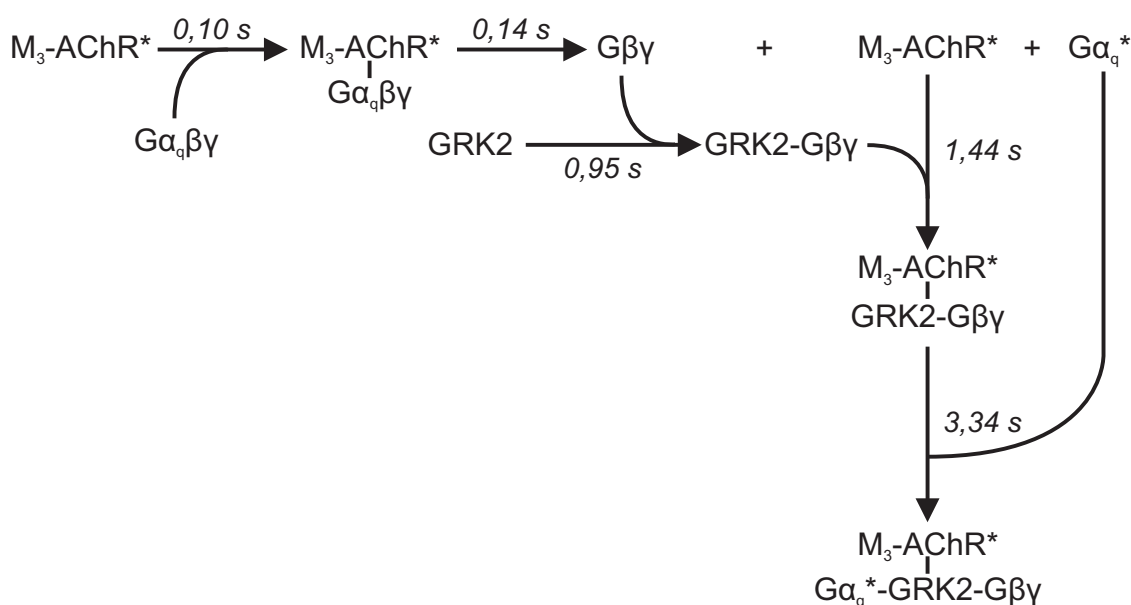


Abbildung 60: Schematische Darstellung der Rekrutierung von GRK2 zum M_3 -AChR

Angegeben sind die durch FRET-Experimente ermittelten Halbwertszeit der verschiedenen Schritte (*: aktive Komponenten).

Wie in Abschnitt 4.1 bereits erwähnt, erfolgte die Dissoziation der GRK2 vom Rezeptor nach Auswaschen des Agonisten in Anwesenheit von $G\alpha_q$ vergleichsweise langsam. Sie zeigte einen biexponentiellen Verlauf mit den beiden Parametern $t_{1/2}(1) = 0,6$ s und $t_{1/2}(2) = 28,9$ s (Abbildung 24B). Dabei spiegelt die langsame Komponente wahrscheinlich die stabil gebundene GRK2 wider, während niedrig-affin gebundene GRK2 schnell dissoziiert. Die übereinstimmende Dissoziationskinetik von GRK2 und von $G\beta\gamma$ vom Rezeptor lässt vermuten, dass GRK2 und $G\beta\gamma$ gleichzeitig vom Rezeptor dissoziieren (Abbildung 43). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die GRK2 in unterschiedlichen Konformationen und mit unterschiedlicher Affinität an den Rezeptor binden kann, abhängig davon, ob $G\beta\gamma$, $G\alpha_q$ oder

beide gebunden sind. Die verzögerte Dissoziation der G $\beta\gamma$ -bindereduzierten GRK2-Mutante vom Rezeptor (Abbildung 20 und Abbildung 24) sowie die höhere Sensitivität der GRK2 (R587Q)-M₃-AChR-Interaktion gegenüber der GRK2-M₃-AChR-Interaktion (Abbildung 51) lassen darauf schließen, dass bei Fehlen der G $\beta\gamma$ -Bindung die Bindeaffinität der GRK2 zum Rezeptor erhöht ist.

Bisher herrschte in der Literatur die Meinung vor, dass die G-Protein-Kopplung an den Rezeptor durch die Rezeptorphosphorylierung nicht beeinflusst wird und dass es erst durch sterische Hinderung nach Bindung von Arrestin an den Rezeptor zu einer Entkopplung der G-Proteine kommt (Lohse et al., 1992). Die in dieser Arbeit gezeigte stabile Interaktion zwischen GRK2 und M₃-AChR legt allerdings nahe, dass die Signalweiterleitung des Rezeptors über die G-Proteine nicht erst nach Bindung von Arrestin, sondern schon zuvor durch die GRK2-Bindung aufgehoben wird. Über diesen Mechanismus könnte die GRK2 zur phosphorylierungsunabhängigen Desensibilisierung des Rezeptors beitragen. Bisher wurde zur phosphorylierungsunabhängigen Desensibilisierung des Rezeptors nur die Sequestrierung von aktiven G α_q - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten durch die GRK2 gezählt, die zu einer Abschwächung der Signalweiterleitung in der Zelle führt (Luo et al., 2008).

Die G $\beta\gamma$ -bindereduzierte GRK2-Mutante dissoziierte verzögert vom Rezeptor (Abbildung 24B). Dies war vergleichbar mit der unterschiedlichen Dissoziation von G α_q und GRK2 beziehungsweise G $\beta\gamma$ und GRK2 (Abbildung 34B). In Verbindung mit der unterschiedlichen Funktionalität der GRK2 in Abhängigkeit der Bindung von G $\beta\gamma$ oder G α_q , unterstützt dies die Hypothese, dass die GRK2 in unterschiedlichen Orientierungen an den Rezeptor binden kann.

Die Dissoziation von G $\beta\gamma$ und GRK2 erfolgte mit einer Halbwertszeit von 25,1 s (Abbildung 34B). Sie war damit nicht signifikant unterschiedlich zur Dissoziation von G α_q und GRK2, die eine Halbwertszeit von 27,1 s aufwies. Allerdings war der Beginn der Dissoziation von G α_q verzögert (Abbildung 34B). Gemeinsam mit der höheren Sensitivität der Interaktion zwischen GRK2 und G α_q im Vergleich zur GRK2-G $\beta\gamma$ -Interaktion (Abbildung 36), wies dies auf eine höhere Bindeaffinität der GRK2 zu G α_q als zu G $\beta\gamma$ hin.

Die Deaktivierung des G_q-Proteins wurde durch die GRK2 beschleunigt. In Abwesenheit der GRK2 dauerte die Reassoziierung des G_q-Proteins etwa doppelt so lang (Abbildung 49). Dies könnte auf eine gewisse GAP-Aktivität der GRK2 hindeuten, die in der Literatur allerdings

nicht eindeutig belegt ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die GRK2 die Bindung von RGS-Proteinen an die $G\alpha_q$ -Untereinheit und somit indirekt die Inaktivierung des G-Proteins fördert. Um zu klären, welcher Mechanismus vorliegt, wären weitere Versuche, z.B. zur GTPase-Rate von $G\alpha_q$ oder zur Rekrutierung von RGS-Proteinen notwendig. Da dies über die Fragestellung dieser Arbeit hinausgeht, kann an dieser Stelle keine abschließende Beurteilung gegeben werden. Trotzdem kann die beschleunigte Deaktivierung der G-Proteine als weitere Funktion der GRK2 angesehen werden, über die sie phosphorylierungsunabhängig in die Desensibilisierung des Rezeptorsignals regulierend eingreifen kann.

Aus den Ergebnissen der Dissoziations-Experimente lässt sich der folgende Ablauf ableiten (Abbildung 61).

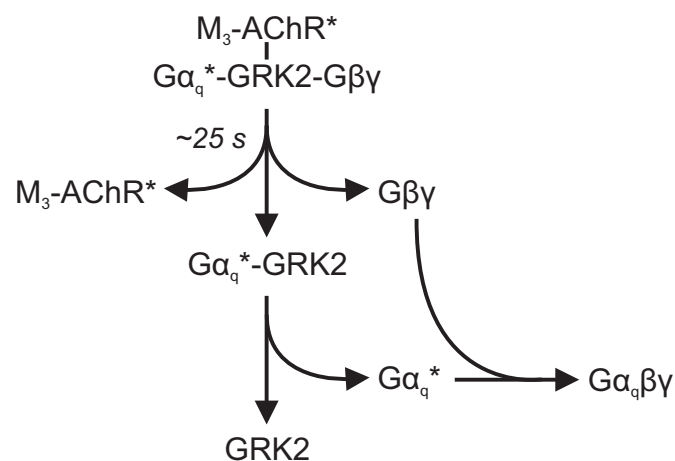


Abbildung 61: Schematische Darstellung der Dissoziation der GRK2 vom M₃-AChR

Angegeben ist die durch FRET-Experimente ermittelte Halbwertszeit des ersten Schritts (*: aktive Komponenten).

Wie zuvor beschrieben, ist die Bindung von Arrestin an den Rezeptor erst nach vorangegangener Rezeptorphosphorylierung durch die GRK2 und Dissoziation derselben vom Rezeptor möglich. Dadurch lässt sich die langsame Rekrutierung des Arrestins zum Rezeptor erklären ($t_{1/2} = 21,4$ s), die zumindest bei der ersten Stimulation des Rezeptors messbar ist (Abbildung 37A). Die Kinetik der Rezeptorphosphorylierung wurde in früheren Studien als $t_{1/2} = 20$ s bestimmt (Krasel et al., 2005), (Roth et al., 1991) und liegt damit im gleichen Bereich wie die Dissoziation der GRK2 vom Rezeptor. Bei einer zweiten Rezeptorstimulation liegen präphosphorylierte Rezeptoren vor, die dann eine schnellere Rekrutierung von Arrestin ermöglichen (Krasel et al., 2005). Die Beschleunigung der Arrestin-Rekrutierung zwischen erster und zweiter Stimulation konnte in dieser Arbeit auch für den M₃-AChR bestätigt

werden (Abbildung 37B). Auffällig war außerdem, dass Arrestin mit $t_{1/2} = 2,82$ s deutlich schneller vom Rezeptor dissoziiert, als die GRK2, was auf eine höhere Bindeaffinität zwischen M_3 -AChR und GRK2 als zwischen M_3 -AChR und Arrestin hindeutet.

Die in dieser Studie ermittelten kinetischen Daten werden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Dr. Leif Hommers vom Klinikum der Universität Würzburg in eine Simulation der zugehörigen Reaktionskonstanten eingehen. Dazu wird unter Zuhilfenahme der Software Virtual Cell (Moraru et al., 2008) ein kinetische Modell erstellt. Abhängig von den gewählten Reaktionsbedingungen und Reaktionskonstanten erzeugt das Programm Zeitverläufe der einzelnen Interaktionen, die mit der experimentell ermittelten Kinetik verglichen werden. Zusätzlich werden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Abschätzung des Ausmaßes der Interaktionen bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen herangezogen. Die Erstellung des kinetischen Modells ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.

4.3 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf dem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer beruhende Experimente etabliert, mit deren Hilfe die Dynamik der Interaktion von GRK2 mit dem M_3 -ACh-Rezeptor sowie mit $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ mit hoher zeitlicher Auflösung in lebenden Einzelzellen sichtbar gemacht werden konnte. Mit diesen und weiteren FRET-Experimenten war es möglich, das vorhandene Wissen zur G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2 um eine detaillierte kinetische Beschreibung ihrer agonistabhängigen Rekrutierung zu G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren sowie ihrer Dissoziation vom Rezeptor nach Auswaschen des Agonisten zu ergänzen. Die Funktion von $G\beta\gamma$ bei der Membrantranslokation der GRK2, die zuvor durch "pull-down"-Experimente und Messungen der Rezeptorphosphorylierung beschrieben wurde, konnte in dieser Arbeit durch FRET-basierte Methoden bestätigt werden. Zusätzlich wurde mit $G\alpha_q$ ein weiterer Einflussfaktor identifiziert, der zur Translokation der GRK2 an die Membran führt. Dies stellt einen neuen Aspekt in der Beschreibung der GRK2-Rekrutierung dar. $G\alpha_q$ spielt darüber hinaus nicht nur eine Rolle in der Membrantranslokation der GRK2, sondern verstärkt auch das Ausmaß und die Stabilität der Interaktion der GRK2 mit G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren. Am Beispiel des M_3 -AChR konnte gezeigt werden, dass sich dies auch auf die Funktionalität der GRK2 auswirkt. Eine effiziente Rezeptorphosphorylierung ist nur bei gleichzeitiger Bindung von $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ an die GRK2 möglich. Obwohl die Experimente - unter anderem durch die schnellere $G\beta\gamma$ -Bindung an die

GRK2 im Vergleich zu $G\alpha_q$ -Bindung - zeigten, dass $G\beta\gamma$ bei der Rekrutierung der GRK2 eine größere Rolle spielt als $G\alpha_q$, konnte trotzdem eine höhere Bindeaffinität zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ nachgewiesen werden. Die in Anwesenheit von $G\alpha_q$ lang anhaltende Interaktion von GRK2 und M_3 -AChR ist außerdem ein Hinweis darauf, dass die Signalweiterleitung des Rezeptors bereits durch die Bindung von GRK2 gehemmt wird, und nicht erst durch die Rekrutierung von Arrestin, wie bisher vermutet. Ein Effekt aktivierter $G\alpha_q$ -Untereinheiten auf die GRK2-Rekrutierung zu G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren konnte nicht beobachtet werden, so dass der Einfluss von $G\alpha_q$ sehr wahrscheinlich auf G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren beschränkt ist. Die in dieser Studie ermittelten kinetischen Daten werden im Rahmen einer Kooperation in eine computerbasierte Simulation der zugehörigen Reaktionskonstanten eingehen und sollen damit zu einem besseren Gesamtverständnis der GRK2-Rekrutierung beitragen. Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die wichtige Rolle von $G\alpha_q$ bei der Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -ACh-Rezeptor beschrieben werden, die höchstwahrscheinlich die Signalweiterleitung und Desensibilisierung G_q -Protein-gekoppelter Rezeptoren beeinflusst. Zudem konnte die kinetische Beschreibung der beteiligten Vorgänge erstmals den zeitlichen Ablauf dieser physiologisch wichtigen Signalwegs entschlüsseln.

5 Zusammenfassung

Die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) ist eine Serin/Threonin-Kinase mit bedeutender Funktion bei der Desensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Die agonistabhängige Rekrutierung der GRK2 zu aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Interaktion mit freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und negativ geladenen Phospholipiden der Membran wurde bereits detailliert erforscht (Pitcher et al., 1992; Touhara et al., 1995). Auch $G\alpha_q$ war als Interaktionspartner der GRK2 bekannt (Carman et al., 1999b). Die GRK2 kann damit auch als Effektor der G-Proteine angesehen werden, der eine phosphorylierungs-unabhängige Desensibilisierung der Rezeptoren durch Sequestrierung aktiver G_q -Protein-Untereinheiten bewirkt. Bisher war allerdings wenig darüber bekannt, ob und welche weiteren Funktionen die Interaktion von $G\alpha_q$ und GRK2 in Bezug auf die Signalweiterleitung G_q -Protein-gekoppelter Rezeptoren besitzt. Darüber hinaus fehlte die detaillierte kinetische Beschreibung der agonistabhängigen Rekrutierung der GRK2 zu aktivierten G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren, sowie der Dissoziation des Komplexes nach Auswaschen des Agonisten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Dynamik der Interaktion der GRK2 mit G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren und anderer an der Rekrutierung der GRK2 beteiligter Interaktionen am Beispiel des M_3 -Acetylcholin (ACh) Rezeptors aufzuklären. Außerdem wurde in diesem Zusammenhang der Einfluss der $G\alpha_q$ -Bindung an die GRK2 untersucht. Dazu wurden neue Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierte Experimente etabliert, mit deren Hilfe die Interaktion der GRK2 mit M_3 -ACh-Rezeptoren sowie mit $G\alpha_q$ und $G\beta\gamma$ mit hoher zeitlicher Auflösung in einzelnen lebenden HEK293T-Zellen sichtbar gemacht werden konnte. Die Stimulation der M_3 -ACh-Rezeptoren mit Acetylcholin führte zu deutlichen FRET-Änderungen, welche die Interaktion der jeweiligen Partner widerspiegeln. Zur Untersuchung des Einflusses der Bindung der G_q -Protein-Untereinheiten an die GRK2 wurden GRK2-Mutanten eingesetzt, die eine reduzierte Bindeaffinität zu $G\alpha_q$ oder $G\beta\gamma$ aufweisen. Die Funktion von $G\beta\gamma$ bei der Membrantranslokation der GRK2, die bisher nur über Endpunktmessungen beschrieben wurde, konnte in dieser Arbeit durch den Einsatz der FRET-Mikroskopie und anderer fluoreszenzmikroskopischer Methoden bestätigt und darüber hinaus erstmals dynamisch vermessen werden. Zusätzlich ergaben die Experimente, dass nicht nur $G\beta\gamma$, sondern auch $G\alpha_q$ in der Lage ist, die GRK2 agonistabhängig an die Membran

zu rekrutieren. Dies stellt einen neuen Aspekt in der Membrantranslokation der GRK2 dar. Ein Vergleich der absoluten FRET-Amplituden der unterschiedlichen GRK2-Mutanten zeigte, dass $G\alpha_q$ zudem das Ausmaß und die Stabilität der Interaktion zwischen GRK2 und dem M_3 -ACh-Rezeptor erhöht. Funktionelle Untersuchungen zur Kinaseaktivität der GRK2 konnten außerdem nachweisen, dass die Bindung von $G\beta\gamma$ an GRK2 zwar notwendige Bedingung für die Phosphorylierung des Rezeptors ist, eine effiziente Rezeptor-phosphorylierung aber nur bei gleichzeitiger Bindung von $G\beta\gamma$ und $G\alpha_q$ an die GRK2 möglich ist. Diese Ergebnisse belegten die wichtige Funktion von $G\alpha_q$ bei der Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -ACh-Rezeptor, auch wenn $G\beta\gamma$ bei der Rekrutierung der GRK2 die größere Rolle spielt. Allerdings bewies die höhere Sensitivität der GRK2- $G\alpha_q$ -Interaktion gegenüber der Interaktion zwischen GRK2 und $G\beta\gamma$, dass die GRK2 eine höhere Bindeaffinität zu $G\alpha_q$ als zu $G\beta\gamma$ besitzt. Die Bedeutung von $G\alpha_q$ bei der Rekrutierung der GRK2 zum Rezeptor wird deshalb bei niedrigen Agonist-Konzentrationen vermutlich verhältnismäßig wichtiger sein. Ein Effekt aktivierter $G\alpha_q$ -Untereinheiten auf die Rekrutierung von GRK2 zu G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden, so dass der Einfluss von $G\alpha_q$ sehr wahrscheinlich auf G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren beschränkt ist. Die durchgeführten FRET-Experimente ermöglichten erstmals die detaillierte kinetische Beschreibung der Rekrutierung der GRK2 zum Rezeptor, beginnend bei der Interaktion inaktiver G-Proteine mit aktiven M_3 -ACh-Rezeptoren bis hin zur Bildung eines Komplexes aus GRK2, $G\alpha_q$, $G\beta\gamma$ und Rezeptor. Es zeigte sich, dass die Interaktion der GRK2 mit $G\beta\gamma$ etwa 3-mal schneller war als die $G\alpha_q$ -Bindung. Die Membrantranslokation der GRK2 durch die G_q -Protein-Bindung ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Interaktion der GRK2 mit dem Rezeptor. Die, in Anwesenheit von $G\alpha_q$, lang anhaltende Interaktion der GRK2 mit dem M_3 -ACh-Rezeptor lieferte einen Hinweis darauf, dass die Signalweiterleitung des Rezeptors bereits durch die Bindung der GRK2 gehemmt wird, und nicht erst durch die Rekrutierung von Arrestin, wie bisher vermutet.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal die wichtige Rolle von $G\alpha_q$ bei der Rekrutierung der GRK2 zum M_3 -ACh-Rezeptor beschrieben werden, die entscheidenden Einfluss auf die Signalweiterleitung und Desensibilisierung G_q -Protein-gekoppelter Rezeptoren ausübt. Darüber hinaus konnte die kinetische Beschreibung der beteiligten Vorgänge erstmals den zeitlichen Ablauf dieses physiologisch wichtigen Signalwegs entschlüsseln.

6 Summary

G-protein-coupled receptor kinase type 2 (GRK2) belongs to the family of serine/threonine-kinases and plays an important role in the desensitisation of G-protein-coupled receptors (GPCR). Its agonist-dependent recruitment to activated GPCRs through interaction with free $G\beta\gamma$ -subunits and negatively charged phospholipids of the plasma membrane has been studied in detail (Pitcher et al., 1992; Touhara et al., 1995). In addition, $G\alpha_q$ was identified to be an interaction partner of GRK2 (Carman et al., 1999b). Thus, GRK2 can be considered to be a G-protein effector that sequesters active G_q -protein subunits and thereby desensitises GPCRs in a phosphorylation-independent manner. It remained unclear, whether – and if so which – additional effects on the signal transduction of G_q -protein-coupled receptors might result from the interaction between $G\alpha_q$ and GRK2. Furthermore, there was no detailed description of the kinetics of the agonist-mediated recruitment of GRK2 to G_q -protein-coupled receptors. Neither were any kinetics data available for the dissociation of receptor and GRK2 after agonist withdrawal.

The aim of this study was to uncover the dynamics of the interaction of GRK2 with G_q -protein-coupled receptors and other proteins involved in the GRK2-recruitment. The M_3 -acetylcholine (ACh) receptor was chosen as a model receptor. In this respect, the influence of $G\alpha_q$ -binding to GRK2 was investigated. Therefore, experiments based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) were established. This technique allowed the visualisation and investigation of the interaction between GRK2 and M_3 -ACh receptors, $G\alpha_q$, and $G\beta\gamma$ -subunits, respectively, in single living HEK293T-cells with high spatio-temporal resolution. Stimulation of M_3 -ACh receptors with acetylcholine resulted in distinct FRET-changes that reflected the interaction of the labelled partner. GRK2-Mutants with reduced affinity to $G\alpha_q$ or $G\beta\gamma$ were used to analyse the influence of G_q -protein binding to GRK2. So far, the role of $G\beta\gamma$ in membrane translocation of GRK2 had only been studied using end-point experiments. This study could confirm the published results using the newly established FRET-assays and other fluorescence-imaging techniques, while also providing for the first time kinetic details. It was further observed that the agonist-dependent membrane targeting of GRK2 is not only mediated by $G\beta\gamma$, but also by $G\alpha_q$, thereby uncovering a new aspect of GRK2 membrane translocation. Furthermore, $G\alpha_q$ increases extent and stability of the interaction of GRK2 and the M_3 -ACh receptor. This fact was revealed by comparison of

the absolute FRET-amplitudes of different GRK2-mutants. Investigation of the kinase activity of GRK2 showed that binding of $G\beta\gamma$ is indeed a necessary prerequisite for receptor phosphorylation, but efficient receptor phosphorylation is only achieved through simultaneous binding of $G\beta\gamma$ and $G\alpha_q$ to GRK2. These results further confirmed the importance of $G\alpha_q$ for the recruitment of GRK2 to activated M_3 -ACh receptors, although $G\beta\gamma$ has a larger effect in this respect. However, GRK2 shows higher affinity towards $G\alpha_q$ than $G\beta\gamma$, which is indicated by the fact that the interaction between GRK2 and $G\alpha_q$ is more sensitive than the GRK2- $G\beta\gamma$ -interaction. Accordingly, $G\alpha_q$ is presumably more important for the GRK2-recruitment at lower agonist concentrations. No effect of activated G_q -protein subunits was observed on the GRK2-recruitment towards G_i -protein-coupled receptors during these studies. Therefore, the observed influence of $G\alpha_q$ is probably limited to G_q -protein-coupled receptors. The FRET-based experiments allowed for the first time the detailed description of the kinetics of GRK2-recruitment to the M_3 -ACh receptor, beginning with the interaction between activated receptor and inactive G_q -proteins and ending at the complex formation of GRK2 with $G\alpha_q$, $G\beta\gamma$ and the receptor. It became evident that the binding between GRK2 and $G\beta\gamma$ occurred about 3-times as fast as the respective interaction of GRK2 with $G\alpha_q$. The membrane translocation of GRK2, mediated through binding to G_q -proteins, is the rate-limiting step for the interaction of GRK2 with the receptor. The interaction between GRK2 and M_3 -ACh receptors was prolonged by $G\alpha_q$. This hints at an inhibition of receptor signalling straight after GRK2 binding and not just after recruitment of arrestin, as assumed previously.

Taken together, this work shows for the first time the importance of $G\alpha_q$ in the translocation of GRK2 towards M_3 -ACh receptors, thereby exerting critical influence on signal transduction and desensitisation of G_q -protein-coupled receptors. Furthermore, this study also provides the first detailed description of the kinetics of all steps involved in this physiologically important pathway.

7 Literaturverzeichnis

- Abrams P, Andersson K, Buccafusco JJ, Chapple C, Groat WC de, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ und Wein AJ (2006) Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* **148**: 565–578.
- Ballou LM, Cross ME, Huang S, McReynolds EM, Zhang BX und Lin RZ (2000) Differential regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p70 S6 kinase pathways by the α_{1A} -adrenergic receptor in rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* **275**: 4803–4809.
- Ballou LM, Lin H, Fan G, Jiang Y und Lin RZ (2003) Activated $G\alpha_q$ inhibits p110 α phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J Biol Chem* **278**: 23472–23479.
- Beautrait A, Michalski KR, Lopez TS, Mannix KM, McDonald DJ, Cutter AR, Medina CB, Hebert AM, Francis CJ, Bouvier M, Tesmer JJG und Sterne-Marr R (2014) Mapping the putative G protein-coupled receptor (GPCR) docking site on GPCR kinase 2: Insights from intact cell phosphorylation and recruitment assays. *J Biol Chem*: 25262–25275.
- Benovic JL, DeBlasi A, Stone WC, Caron MG und Lefkowitz RJ (1989) β -adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* **246**: 235–240.
- Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG und Lefkowitz RJ (1985) Phosphorylation of the mammalian β -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **260**: 7094–7101.
- Benovic JL, Strasser RH, Caron MG und Lefkowitz RJ (1986) β -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2797–2801.
- Berney C und Danuser G (2003) FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophys J* **84**: 3992–4010.
- Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 933–940.

- Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG und Ross EM (1992) Phospholipase C- β 1 is a GTPase-activating protein for $G_{q/11}$, its physiologic regulator. *Cell* **70**: 411–418.
- Bhattacharya S, Mahavadi S, Al-Shboul O, Rajagopal S, Grider JR und Murthy KS (2013) Differential regulation of muscarinic M_2 and M_3 receptor signaling in gastrointestinal smooth muscle by caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* **305**: C334–47.
- Booden MA, Siderovski DP und Der CJ (2002) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G_{α_q} -coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol* **22**: 4053–4061.
- Bos JL, Rehmann H und Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**: 865–877.
- Boughton AP, Yang P, Tesmer VM, Ding B, Tesmer JJG und Chen Z (2011) Heterotrimeric G protein $\beta_1\gamma_2$ subunits change orientation upon complex formation with G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) on a model membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **108**: E667–73.
- Breton B, Lagace M und Bouvier M (2010) Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the α_{2A} -adrenergic receptor, $G_{\alpha_i}\beta_1\gamma_2$, and GRK2. *FASEB J* **24**: 4733–4743.
- Brockmann, Jörg (2005) Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptorkinasen.
- Bünemann M, Frank M und Lohse MJ (2003) G_i protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 16077–16082.
- Carman CV, Barak LS, Chen C, Liu-Chen LY, Onorato JJ, Kennedy SP, Caron MG und Benovic JL (2000) Mutational analysis of $G\beta\gamma$ and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* **275**: 10443–10452.
- Carman CV, Lisanti MP und Benovic JL (1999a) Regulation of G protein-coupled receptor kinases by caveolin. *J Biol Chem* **274**: 8858–8864.
- Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL und Kozasa T (1999b) Selective regulation of $G_{\alpha_{q/11}}$ by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274**: 34483–34492.
- Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* **58**: 319–379.

- Caulfield MP und Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**: 279–290.
- Chen CY, Dion SB, Kim CM und Benovic JL (1993) β -adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J Biol Chem* **268**: 7825–7831.
- Chen M, Sato PY, Chuprun JK, Peroutka RJ, Otis NJ, Ibetti J, Pan S, Sheu S, Gao E und Koch WJ (2013) Prodeath signaling of G protein-coupled receptor kinase 2 in cardiac myocytes after ischemic stress occurs via extracellular signal-regulated kinase-dependent heat shock protein 90-mediated mitochondrial targeting. *Circulation Research* **112**: 1121–1134.
- Chuang TT, LeVine H und Blasi A de (1995) Phosphorylation and activation of β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* **270**: 18660–18665.
- Chuang TT, Paolucci L und Blasi A de (1996) Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca^{2+} /calmodulin. *J Biol Chem* **271**: 28691–28696.
- Ciccarelli M, Chuprun JK, Rengo G, Gao E, Wei Z, Peroutka RJ, Gold JI, Gumpert A, Chen M, Otis NJ, Dorn GW, Trimarco B, Iaccarino G und Koch WJ (2011) G protein-coupled receptor kinase 2 activity impairs cardiac glucose uptake and promotes insulin resistance after myocardial ischemia. *Circulation* **123**: 1953–1962.
- Cong M, Perry SJ, Lin FT, Fraser ID, Hu LA, Chen W, Pitcher JA, Scott JD und Lefkowitz RJ (2001) Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* **276**: 15192–15199.
- Conklin BR und Bourne HR (1993) Structural elements of $\text{G}\alpha$ subunits that interact with $\text{G}\beta\gamma$, receptors, and effectors. *Cell* **73**: 631–641.
- Coulson FR und Fryer AD (2003) Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* **98**: 59–69.
- Day PW, Carman CV, Sterne-Marr R, Benovic JL und Wedegaertner PB (2003) Differential interaction of GRK2 with members of the $\text{G}\alpha_q$ family. *Biochemistry* **42**: 9176–9184.
- Day PW, Tesmer JJG, Sterne-Marr R, Freeman LC, Benovic JL und Wedegaertner PB (2004) Characterization of the GRK2 binding site of $\text{G}\alpha_q$. *J Biol Chem* **279**: 53643–53652.
- DebBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL und Hosey MM (1996) G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* **271**: 22552–22562.

- DiBello PR (1998) Selective uncoupling of RGS action by a single point mutation in the G protein α -subunit. *J Biol Chem* **273**: 5780–5784.
- Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA und Schlessinger J (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* **383**: 547–550.
- Dorn GW, II., Tepe NM, Wu G, Yatani A und Liggett SB (2000) Mechanisms of impaired β -adrenergic receptor signaling in $G\alpha_q$ -mediated cardiac hypertrophy and ventricular dysfunction. *Mol Pharmacol* **57**: 278–287.
- Dorsch S, Klotz K, Engelhardt S, Lohse MJ und Bünemann M (2009) Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods* **6**: 225–230.
- Dunphy JT und Linder ME (1998) Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* **1436**: 245–261.
- Dupre DJ, Robitaille M, Rebois RV und Hebert TE (2009) The role of $G\beta\gamma$ subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 31–56.
- Echeverría V, Hinrichs MV, Torrejón M, Ropero S, Martinez J, Toro MJ und Olate J (2000) Mutagenesis in the switch IV of the helical domain of the human $G\alpha$ reduces its GDP/GTP exchange rate. *J Cell Biochem* **76**: 368–375.
- Elorza A, Sarnago S und Mayor F, JR (2000) Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* **57**: 778–783.
- Etienne-Manneville S und Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629–635.
- Evanko DS, Thiyagarajan MM und Wedegaertner PB (2000) Interaction with $G\beta\gamma$ is required for membrane targeting and palmitoylation of $G\alpha_s$ and $G\alpha_q$. *J Biol Chem* **275**: 1327–1336.
- Fernandez N, Gottardo FL, Alonso MN, Monczor F, Shayo C und Davio C (2011) Roles of phosphorylation-dependent and -independent mechanisms in the regulation of histamine H_2 receptor by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* **286**: 28697–28706.
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ und Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science* **280**: 1271–1274.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* **437**: 55–75.

- Frank M, Thümer L, Lohse M und Bünemann M (2005) G protein activation without subunit dissociation depends on a $G\alpha_i$ -specific region. *J Biol Chem* **280**: 24584–24590.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L und Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**: 1256–1272.
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T und Gutkind JS (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* **274**: 5868–5879.
- Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE und Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**: 177–184.
- Gao X, Sadana R, Dessauer CW und Patel TB (2007) Conditional stimulation of type V and VI adenylyl cyclases by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* **282**: 294–302.
- Garcia-Guerra L, Nieto-Vazquez I, Vila-Bedmar R, Jurado-Pueyo M, Zalba G, Diez J, Murga C, Fernandez-Veledo S, Mayor F und Lorenzo M (2010) G protein-coupled receptor kinase 2 plays a relevant role in insulin resistance and obesity. *Diabetes* **59**: 2407–2417.
- Garcia-Hoz C, Sanchez-Fernandez G, Diaz-Meco MT, Moscat J, Mayor F und Ribas C (2010) $G\alpha_q$ acts as an adaptor protein in protein kinase C ζ (PKC ζ)-mediated ERK5 activation by G protein-coupled receptors (GPCR). *J Biol Chem* **285**: 13480–13489.
- Garcia-Hoz C, Sanchez-Fernandez G, Garcia-Escudero R, Fernandez-Velasco M, Palacios-Garcia J, Ruiz-Meana M, Diaz-Meco MT, Leitges M, Moscat J, Garcia-Dorado D, Bosca L, Mayor F, JR und Ribas C (2012) Protein kinase C (PKC) ζ -mediated $G\alpha_q$ stimulation of ERK5 protein pathway in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* **287**: 7792–7802.
- Gautam D, Han S, Hamdan FF, Jeon J, Li B, Li JH, Cui Y, Mears D, Lu H, Deng C, Heard T und Wess J (2006) A critical role for β cell M_3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab* **3**: 449–461.
- Gautam D, Jeon J, Starost MF, Han S, Hamdan FF, Cui Y, Parlow AF, Gavrilova O, Szalayova I, Mezey E und Wess J (2009) Neuronal M_3 muscarinic acetylcholine receptors are essential for somatotroph proliferation and normal somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6398–6403.

- Ghose S, Porzig H und Baltensperger K (1999) Induction of erythroid differentiation by altered $G\alpha_{16}$ activity as detected by a reporter gene assay in MB-02 cells. *J Biol Chem* **274**: 12848–12854.
- Gibson SK und Gilman AG (2006) $G\alpha$ and $G\beta$ subunits both define selectivity of G protein activation by α_2 -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 212–217.
- Gibson TJ, Hyvönen M, Musacchio A, Saraste M und Birney E (1994) PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* **19**: 349–353.
- Giepmans BNG, Adams SR, Ellisman MH und Tsien RY (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**: 217–224.
- Gilchrist A, Li A und Hamm HE (2002) $G\alpha$ COOH-terminal minigene vectors dissect heterotrimeric G protein signaling. *Sci STKE* **2002**: 1–18.
- Gilchrist A, Vanhauwe JF, Li A, Thomas TO, Voyno-Yasenetskaya T und Hamm HE (2001) $G\alpha$ minigenes expressing C-terminal peptides serve as specific inhibitors of thrombin-mediated endothelial activation. *J Biol Chem* **276**: 25672–25679.
- Gilman AG (1987) G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615–649.
- Goedhart J, van Weeren L, Hink MA, Vischer NOE, Jalink K und Gadella TWJ (2010) Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat Methods* **7**: 137–139.
- Greenbaum L, Rothmann C, Lavie R und Malik Z (2000) Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen. *Biol Chem* **381**: 1251–1258.
- Griesbeck O (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. mechanism and applications. *J Biol Chem* **276**: 29188–29194.
- Griffin BA, Adams SR und Tsien RY (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**: 269–272.
- Guex N und Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714–2723.
- Gurevich EV, Tesmer JJG, Mushegian A und Gurevich VV (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther* **133**: 40–69.

- Haga K und Haga T (1992) Activation by G protein $\beta\gamma$ subunits of agonist- or light-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors and rhodopsin. *J Biol Chem* **267**: 2222–2227.
- Haga T (2013) Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad* **89**: 226–256.
- Harden TK, Waldo GL, Hicks SN und Sondek J (2011) Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C- β signaling nodes. *Chem Rev* **111**: 6120–6129.
- Hasbi A, Devost D, Laporte SA und Zingg HH (2004) Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2. *Mol Endocrinol* **18**: 1277–1286.
- Hata JA und Koch WJ (2003) Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease. *Mol Interv* **3**: 264–272.
- Hausdorff WP, Caron MG und Lefkowitz RJ (1990) Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* **4**: 2881–2889.
- Head BP, Patel HH und Insel PA (2014) Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* **1838**: 532–545.
- Heim R und Tsien RY (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**: 178–182.
- Hein P, Rochais F, Hoffmann C, Dorsch S, Nikolaev VO, Engelhardt S, Berlot CH, Lohse MJ und Bunemann M (2006) G_s activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* **281**: 33345–33351.
- Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD und Gilman AG (1987) Effects of Mg^{2+} and the $\beta\gamma$ -subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J Biol Chem* **262**: 762–766.
- Hildreth KL (2004) Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor- by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na^+/H^+ exchanger regulatory factor. *J Biol Chem* **279**: 41775–41782.

- Hisatomi O, Matsuda S, Satoh T, Kotaka S, Imanishi Y und Tokunaga F (1998) A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors. *FEBS Lett* **424**: 159–164.
- Hoffmann C, Nuber S, Zabel U, Ziegler N, Winkler C, Hein P, Berlot CH, Bünemann M und Lohse MJ (2012) Comparison of the activation kinetics of the M₃ acetylcholine receptor and a constitutively active mutant receptor in living cells. *Mol Pharmacol* **82**: 236–245.
- Hommers LG, Klenk C, Dees C und Bünemann M (2010) G proteins in reverse mode: Receptor-mediated GTP release inhibits G protein and effector function. *J Biol Chem* **285**: 8227–8233.
- Hubbard KB und Hepler JR (2006) Cell signalling diversity of the Gqα family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* **18**: 135–150.
- Hughes TE, Zhang H, Logothetis DE und Berlot CH (2001) Visualization of a functional Gα_q-green fluorescent protein fusion in living cells. Association with the plasma membrane is disrupted by mutational activation and by elimination of palmitoylation sites, but not by activation mediated by receptors or AlF₄⁻. *J Biol Chem* **276**: 4227–4235.
- Hu J, Wang Y, Zhang X, Lloyd JR, Li JH, Karpiak J, Costanzi S und Wess J (2010) Structural basis of G protein-coupled receptor–G protein interactions. *Nat Chem Biol* **6**: 541–548.
- Inglese J, Koch WJ, Caron MG und Lefkowitz RJ (1992) Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* **359**: 147–150.
- Jaiswal JK und Simon SM (2004) Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol.* **14**: 497–504.
- Jares-Erijman EA und Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nat Biotechnol* **21**: 1387–1395.
- Jensen JB, Lyssand JS, Hague C und Hille B (2009) Fluorescence changes reveal kinetic steps of muscarinic receptor-mediated modulation of phosphoinositides and Kv7.2/7.3 K⁺ channels. *J Gen Physiol* **133**: 347–359.
- Jones DT und Reed RR (1989) G_{olf}: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**: 790–795.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J und Waterfield MD (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 615–675.

- Kehat I und Molkentin JD (2010) Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **122**: 2727–2735.
- Klein S, Reuveni H und Levitzki A (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3219–3223.
- Koch WJ, Inglese J, Stone WC und Lefkowitz RJ (1993) The binding site for the $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins on the β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**: 8256–8260.
- Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA und Lefkowitz RJ (1995) Cardiac function in mice overexpressing the β -adrenergic receptor kinase or a β ARK inhibitor. *Science* **268**: 1350–1353.
- Kong G, Penn R und Benovic JL (1994) A β -adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **269**: 13084–13087.
- Kosloff M, Elia N und Selinger Z (2002) Structural homology discloses a bifunctional structural motif at the N-termini of G α proteins. *Biochemistry* **41**: 14518–14523.
- Krasel C, Bünemann M, Lorenz K und Lohse MJ (2005) β -arrestin binding to the β_2 -adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem* **280**: 9528–9535.
- Krasel C, Dammeier S, Winstel R, Brockmann J, Mischak H und Lohse MJ (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* **276**: 1911–1915.
- Krupnick JG und Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289–319.
- Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Wess J und Kobilka BK (2012) Structure and dynamics of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482**: 552–556.
- Lagerstrom MC und Schioth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 339–357.
- Lefkowitz RJ, Hausdorff WP und Caron MG (1990) Role of phosphorylation in desensitization of the β -adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 190–194.

- Linder ME, Middleton P, Hepler JR, Taussig R, Gilman AG und Mumby SM (1993) Lipid modifications of G proteins: α subunits are palmitoylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3675–3679.
- Lippert E, Baltensperger K, Jacques Y und Hermouet S (1997) $G\alpha_{16}$ protein expression is up- and down-regulated following T-cell activation: disruption of this regulation impairs activation-induced cell responses. *FEBS Lett.* **417**: 292–296.
- Li Y (1998) Sites for $G\alpha$ binding on the G protein β subunit overlap with sites for regulation of phospholipase C β and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **273**: 16265–16272.
- Lodowski DT (2003) Keeping G proteins at bay: A complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and $G\beta\gamma$. *Science* **300**: 1256–1262.
- Lodowski DT, Barnhill JF, Pyskadlo RM, Ghirlando R, Sterne-Marr R und Tesmer JJG (2005) The role of $G\beta\gamma$ and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry* **44**: 6958–6970.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ und Clapham DE (1987) The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* **325**: 321–326.
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG und Lefkowitz RJ (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β_2 -adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* **267**: 8558–8564.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG und Lefkowitz RJ (1990) β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science* **248**: 1547–1550.
- Lohse MJ, Nuber S und Hoffmann C (2012) Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev* **64**: 299–336.
- Lorenz W, Inglese J, Palczewski K, Onorato JJ, Caron MG und Lefkowitz RJ (1991) The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the β -adrenergic receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8715–8719.
- Luo J, Busillo JM und Benovic JL (2008) M_3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol* **74**: 338–347.

- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M und Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between $G_{q/11}$ -coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**: 11134–11139.
- Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR, Vettel C, Baltus D, Evelyn CR, Neubig RR, Wieland T und Tesmer JJG (2007) Structure of G_{α_q} -p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **318**: 1923–1927.
- Lyon AM und Tesmer JJG (2013) Structural insights into phospholipase C- β function. *Mol Pharmacol* **84**: 488–500.
- Lyon AM, Tesmer VM, Dhamsania VD, Thal DM, Gutierrez J, Chowdhury S, Suddala KC, Northup JK und Tesmer JJG (2011) An autoinhibitory helix in the C-terminal region of phospholipase C- β mediates G_{α_q} activation. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 999–1005.
- Malhotra R, D'Souza KM, Staron ML, Birukov KG, Bodi I und Akhter SA (2010) G_{α_q} -mediated activation of GRK2 by mechanical stretch in cardiac myocytes: the role of protein kinase C. *J Biol Chem* **285**: 13748–13760.
- Mariggio S, García-Hoz C, Sarnago S, Blasi A de, Mayor F und Ribas C (2006) Tyrosine phosphorylation of G-protein-coupled-receptor kinase 2 (GRK2) by c-Src modulates its interaction with G_{α_q} . *Cell Signal* **18**: 2004–2012.
- Milligan G und Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147**: 46–55.
- Mishra S, Ling H, Grimm M, Zhang T, Bers DM und Brown JH (2010) Cardiac hypertrophy and heart failure development through G_q and CaM kinase II signaling. *J Cardiovasc Pharmacol* **56**: 598–603.
- Miyawaki A (2011) Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu Rev Biochem* **80**: 357–373.
- Mizuno N und Itoh H (2009) Functions and regulatory mechanisms of G_q -signaling pathways. *Neurosignals* **17**: 42–54.
- Moffett S, Brown DA und Linder ME (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem* **275**: 2191–2198.

- Moraru I, Morgan F, Li Y, Loew L, Schaff J, Lakshminarayana A, Slepchenko B, Gao F und Blinov M (2008) Virtual Cell modelling and simulation software environment. *IET Systems Biology* **2**: 352–362.
- Mumby SM, Casey PJ, Gilman AG, Gutowski S und Sternweis PC (1990) G protein γ subunits contain a 20-carbon isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5873–5877.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K und Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**: 87–90.
- Nikolaev VO (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**: 37215–37218.
- Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* **9**: 484–496.
- Nygaard R, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM und Schwartz TW (2009) Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* **30**: 249–259.
- Offermanns S, Hashimoto K, Watanabe M, Sun W, Kurihara H, Thompson RF, Inoue Y, Kano M, Simon und MI (1997) Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking $G\alpha_q$. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14089–14094.
- Oh P und Schnitzer JE (2001) Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G_q binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G_i and G_s target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* **12**: 685–698.
- Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY und Korsching SI (2009) The fifth class of $G\alpha$ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1484–1489.
- Oldham WM und Hamm HE (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* **39**: 117–166.
- Oldham WM und Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 60–71.
- Onorato JJ, Gillis ME, Liu Y, Benovic JL und Ruoho AE (1995) The β -adrenergic receptor kinase (GRK2) is regulated by phospholipids. *J Biol Chem* **270**: 21346–21353.

- Palczewski K und Benovic JL (1991) G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Biochem Sci* **16**: 387–391.
- Palczewski K, Buczylo J, Lebiada L, Crabb JW und Polans AS (1993) Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin. *J Biol Chem* **268**: 6004–6013.
- Pao CS, Barker BL und Benovic JL (2009) Role of the amino terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 in receptor phosphorylation. *Biochemistry* **48**: 7325–7333.
- Pavan B, Biondi C und Dalpiaz A (2009) Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov Today* **14**: 982–991.
- Pearce LR, Komander D und Alessi DR (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 9–22.
- Pédélecq J, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC und Waldo GS (2005) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**: 79–88.
- Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S und Mayor F, JR (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **69**: 46–56.
- Phillips WJ und Cerione RA (1992) Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin- $\beta\gamma$ subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* **267**: 17032–17039.
- Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ und Lefkowitz RJ (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem* **271**: 24907–24913.
- Pitcher JA, Freedman NJ und Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 653–692.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG und Lefkowitz RJ (1992) Role of $\beta\gamma$ subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**: 1264–1267.
- Pitcher JA, Touhara K, Payne ES und Lefkowitz RJ (1995) Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β -adrenergic receptor kinase

- requires coordinate interaction with G $\beta\gamma$ subunits and lipid. *J Biol Chem* **270**: 11707–11710.
- Poulin B, Butcher A, McWilliams P, Bourgognon J, Pawlak R, Kong KC, Bottrill A, Mistry S, Wess J, Rosethorne EM, Charlton SJ und Tobin AB (2010) The M₃-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9440–9445.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG und Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229–233.
- Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA, Ambrose C, Inglese J, MacDonald ME und Lefkowitz RJ (1996) Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J Biol Chem* **271**: 6403–6410.
- Quitterer U und Lohse MJ (1999) Crosstalk between G α_i - and G α_q -coupled receptors is mediated by G $\beta\gamma$ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10626–10631.
- Raveh A, Cooper A, Guy-David L und Reuveny E (2010) Nonenzymatic rapid control of GIRK channel function by a G protein-coupled receptor kinase. *Cell* **143**: 750–760.
- Rebois RV, Warner DR und Basi NS (1997) Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins? *Cell Signal* **9**: 141–151.
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem (Annual Review of Biochemistry)* **70**: 281–312.
- Rizzo MA, Springer GH, Granada B und Piston DW (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22**: 445–449.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SGF und Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**: 356–363.
- Ross EM (2011) G α_q and phospholipase C- β : turn on, turn off, and do it fast. *Sci Signal* **4**: 5.
- Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ und Lohse MJ (1991) Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6201–6204.
- Sadana R, Dascal N und Dessauer CW (2009) N terminus of type 5 adenylyl cyclase scaffolds Gs heterotrimer. *Mol Pharmacol* **76**: 1256–1264.

- Sallese M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L und De Blasi A (2000) Selective regulation of G_q signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated G_{αq}. *Mol Pharmacol* **57**: 826–831.
- Sanchez-Fernandez G, Cabezudo S, Garcia-Hoz C, Beninca C, Aragay AM, Mayor F, JR und Ribas C (2014) G_{αq} signalling: The new and the old. *Cell Signal* **26**: 833–848.
- Sarnago S, Elorza A und Mayor F, JR (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**: 34411–34416.
- Sarnago S, Roca R, Blasi A de, Valencia A, Mayor F und Murga C (2003) Involvement of intramolecular interactions in the regulation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Pharmacol* **64**: 629–639.
- Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauß N, Choe H, Hofmann KP und Ernst OP (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**: 497–502.
- Sengupta P, Philip F und Scarlata S (2008) Caveolin-1 alters Ca²⁺ signal duration through specific interaction with the G_{αq} family of G proteins. *J Cell Science* **121**: 1363–1372.
- Shankaranarayanan A, Boguth CA, Lutz S, Vettel C, Uhlemann F, Aittaleb M, Wieland T und Tesmer JJG (2010) G_{αq} allosterically activates and relieves autoinhibition of p63RhoGEF. *Cell Signal* **22**: 1114–1123.
- Shankaranarayanan A, Thal DM, Tesmer VM, Roman DL, Neubig RR, Kozasa T und Tesmer JJG (2008) Assembly of high order G_{αq}-effector complexes with RGS proteins. *J Biol Chem* **283**: 34923–34934.
- Shimomura O, Johnson FH und Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223–239.
- Shi Y, Oury F, Yadav VK, Wess J, Liu XS, Guo XE, Murshed M und Karsenty G (2010) Signaling through the M₃ muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. *Cell Metab* **11**: 231–238.
- Simonds WF, Butrynski JE, Gautam N, Unson CG und Spiegel AM (1991) G-protein βγ dimers. Membrane targeting requires subunit coexpression and intact γ C-A-A-X domain. *J Biol Chem* **266**: 5363–5366.

- Simon MI, Offermanns S, Toombs CF und Hu Y (1997) Defective platelet activation in $G\alpha_q$ -deficient mice. *Nature* **389**: 183–186.
- Simon MI, Strathmann MP und Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802–808.
- Smotrys JE und Linder ME (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* **73**: 559–587.
- Sowa G (2012) Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Front Physiol* **2**: 120.
- Sprang SR, Chen Z und Du X (2007) Structural basis of effector regulation and signal termination in heterotrimeric $G\alpha$ proteins. *Adv Protein Chem* **74**: 1–65.
- Stengel PW, Gomez J, Wess J und Cohen ML (2000) M_2 and M_4 receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **292**: 877–885.
- Sterne-Marr R, Tesmer JJG, Day PW, Stracquatano RP, Cilente JAE, O'Connor KE, Pronin AN, Benovic JL und Wedegaertner PB (2003) G protein-coupled receptor kinase 2/ $G\alpha_{q/11}$ interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding $G\alpha$ subunits. *J Biol Chem* **278**: 6050–6058.
- Stoffel RH, Randall RR, Premont RT, Lefkowitz RJ und Inglese J (1994) Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J Biol Chem* **269**: 27791–27794.
- Tateyama M und Kubo Y (2013) Analyses of the effects of G_q protein on the activated states of the muscarinic M_3 receptor and the purinergic $P2Y_1$ receptor. *Physiol Rep* **1**: 1–13.
- Taussig R, Tang WJ, Hepler JR und Gilman AG (1994) Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **269**: 6093–6100.
- Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG und Exton JH (1991) Activation of the $\beta 1$ isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G proteins. *Nature* **350**: 516–518.
- Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG und Sprang SR (1997) Structure of RGS4 bound to AlF_4^- -activated $G_{i\alpha 1}$: stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* **89**: 251–261.
- Tesmer JJG (2009) Structure and function of regulator of G protein signaling homology domains. *Prog Mol Biol Transl Sci* **86**: 75–113.

- Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T und Tesmer JJG (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the $G\alpha_q$ -GRK2- $G\beta\gamma$ complex. *Science* **310**: 1686–1690.
- Touhara K (1997) Binding of multiple ligands to pleckstrin homology domain regulates membrane translocation and enzyme activity of β -adrenergic receptor kinase. *FEBS Lett* **417**: 243–248.
- Touhara K, Koch WJ, Hawes BE und Lefkowitz RJ (1995) Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the β -adrenergic receptor kinase. Differential effects on $G\beta\gamma$ and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding. *J Biol Chem* **270**: 17000–17005.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509–544.
- Turjanski AG, Vaqué JP und Gutkind JS (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**: 3240–3253.
- Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E und Lohse MJ (1993) Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β_1 -adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**: 454–463.
- Usui H, Nishiyama M, Moroi K, Shibasaki T, Zhou J, Ishida J, Fukamizu A, Haga T, Sekiya S und Kimura S (2000) RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits G_q -mediated signaling. *Int J Mol Med* **5**: 335–340.
- Volpicelli LA und Levey AI (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* **145**: 59–66.
- Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, Wang X, Montell C, Kozasa T, Sondek J und Harden TK (2010) Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C- β and G_q signaling complex. *Science* **330**: 974–980.
- Watson N, Linder ME, Druey KM, Kehrl JH und Blumer KJ (1996) RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein α -subunits. *Nature* **383**: 172–175.
- Wedegaertner PB, Wilson PT und Bourne HR (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem* **270**: 503–506.
- Weller M, Virmaux N und Mandel P (1975) Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: the presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 381–385.

- Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* **10**: 69–99.
- Wess J, Eglen RM und Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 721–733.
- Wettschureck N und Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**: 1159–1204.
- Wettschureck N, van der Stelt M, Tsubokawa H, Krestel H, Moers A, Petrosino S, Schutz G, Di Marzo V und Offermanns S (2006) Forebrain-specific inactivation of G_q/G₁₁ family G proteins results in age-dependent epilepsy and impaired endocannabinoid formation. *Mol Cell Biol* **26**: 5888–5894.
- White DC, Hata JA, Shah AS, Glower DD, Lefkowitz RJ und Koch WJ (2000) Preservation of myocardial β -adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5428–5433.
- Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ und Simon MI (1991) Characterization of G-protein α subunits in the G_q class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10049–10053.
- Winstel R, Freund S, Krasel C, Hoppe E und Lohse MJ (1996) Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the β -adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2105–2109.
- Wise A, Watson-Koken MA, Rees S, Lee M und Milligan G (1997) Interactions of the α_{2A} -adrenoceptor with multiple G_i-family G-proteins: studies with pertussis toxin-resistant G-protein mutants. *Biochem J* **321**: 721–728.
- Wolters V, Krasel C, Brockmann J und Bünemann M (2014) Influence of G α_q on the dynamics of M₃-ACh-receptor-GRK2 interaction. Akzeptiert bei *Mol Pharmacol*
- Wu G, Benovic JL, Hildebrandt JD und Lanier SM (1998) Receptor docking sites for G-protein $\beta\gamma$ subunits. Implications for signal regulation. *J Biol Chem* **273**: 7197–7200.
- Wu G, Bogatkevich GS, Mukhin YV, Benovic JL, Hildebrandt JD und Lanier SM (2000) Identification of G $\beta\gamma$ binding sites in the third intracellular loop of the M₃-muscarinic receptor and their role in receptor regulation. *J Biol Chem* **275**: 9026–9034.

- Xie P, Browning DD, Hay N, Mackman N und Ye RD (2000) Activation of NF- κ B by bradykinin through a G α_q - and G $\beta\gamma$ -dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. *J Biol Chem* **275**: 24907–24914.
- Xu X, Zeng W, Popov S, Berman DM, Davignon I, Yu K, Yowe D, Offermanns S, Muallem S und Wilkie TM (1999) RGS proteins determine signaling specificity of G $_q$ -coupled receptors. *J Biol Chem* **274**: 3549–3556.
- Zacharias DA (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**: 913–916.
- Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J und Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α_1 subunit. *Nature* **385**: 442–446.
- Zamponi GW und Currie KPM (2013) Regulation of Ca $_v$ 2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1828**: 1629–1643.
- Zhang S, Coso OA, Collins R, Gutkind JS und Simonds WF (1996) A C-terminal mutant of the G protein β subunit deficient in the activation of phospholipase C- β . *J Biol Chem* **271**: 20208–20212.
- Zhong H und Neubig R (2001) Regulation of G protein signaling proteins: Novel multifunctional drug targets. *J Pharmacol Exp Ther* **297**: 837–845.
- Ziegler N, Bätz J, Zabel U, Lohse MJ und Hoffmann C (2011) FRET-based sensors for the human M $_1$ -, M $_3$ -, and M $_5$ -acetylcholine receptors. *Bioorg Med Chem* **19**: 1048–1054.
- Zylbergold P, Ramakrishnan N und Hebert T (2010) The role of G proteins in assembly and function of Kir3 inwardly rectifying potassium channels. *Channels* **4**: 411–421.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des M ₃ -ACh-Rezeptors (PDB 4DAJ Kruse et al., 2012)	3
Abbildung 2: Schema des G-Protein Zyklus (modifiziert nach Milligan und Kostenis, 2006). 5	
Abbildung 3: Struktur von Gα _q (PDB 2BCJ Tesmer et al., 2005)	8
Abbildung 4: Funktionelle Domänen der GRK2	17
Abbildung 5: Prinzip eines FRET-Experiments.....	25
Abbildung 6: Plasmidkarte von pcDNA3 (Produktionformation von Invitrogen)	31
Abbildung 7: Beispielhafter Ablauf einer PCR.....	36
Abbildung 8: Beispielhafter Ablauf einer Mutagenese.....	37
Abbildung 9: Strahlengang durch 455LP- und CFP/YFP-Filter	51
Abbildung 10: Absorptions- und Emissionsspektrum von CFP und YFP	53
Abbildung 11: Auswertung der absoluten FRET-Änderung.....	54
Abbildung 12: Kinetische Auswertung der FRET-Änderung.....	55
Abbildung 13: Beispielhafte FRET-Messung zur Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve.....	56
Abbildung 14: Membrantranslokation der GRK2 mit und ohne überexprimierte G-Proteine	60
Abbildung 15: Schematische Darstellung der eingefügten Mutationen in der GRK2	60
Abbildung 16: Membrantranslokation der unterschiedlichen GRK2-Mutanten.....	62
Abbildung 17: Repräsentative FRET-Messung zwischen M ₃ -AChR-YFP und GRK2-mTurq	63

Abbildung 18: Bestätigung der Spezifität des FRET-Signals zwischen M ₃ -AChR-YFP und GRK2-mTurq	64
Abbildung 19: Amplitude des FRET-Signals zwischen M ₃ -AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	65
Abbildung 20: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M ₃ -AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Varianten	66
Abbildung 21: Relative Expressionslevel zwischen M ₃ -AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Varianten	69
Abbildung 22: Repräsentative FRET-Messung zwischen M ₃ -AChR-mTurq und GRK2-YFP	70
Abbildung 23: Amplitude des FRET-Signals und relatives Expressionslevel zwischen M ₃ -AChR-mTurq und den unterschiedlichen GRK2-YFP-Varianten	70
Abbildung 24: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M ₃ -AChR-mTurq und den unterschiedlichen GRK2-Varianten	71
Abbildung 25: Amplitude des FRET-Signals und relatives Expressionslevel zwischen M ₃ -AChR-mTurq und GRK2-YFP ohne Überexpression von Gβγ, Gα _q oder des kompletten Heterotrimers	73
Abbildung 26: „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M ₃ -AChR-mTurq und GRK2-YFP ohne Überexpression von Gβγ, Gα _q oder des kompletten Heterotrimers	73
Abbildung 27: Amplitude des FRET-Signals und relative Expression zwischen M ₃ -AChR-mTurq und GRK2-YFP bei Überexpression von Gα _q (P185K)	75
Abbildung 28: Agonistabhängige Membrantranslokation der unterschiedlichen GRK2-Varianten	77
Abbildung 29: Zeitverlauf der Membrantranslokation der unterschiedlichen GRK2-Mutanten	78

Abbildung 30: Repräsentative FRET-Messung zwischen GRK2-YFP und Cer-G β_1	79
Abbildung 31: Repräsentative FRET-Messung zwischen GRK2-mTurq und G α_q -YFP	80
Abbildung 32: Amplitude des FRET-Signals zwischen G $\beta\gamma$ und den unterschiedlichen GRK2-Varianten	81
Abbildung 33: Amplitude des FRET-Signals zwischen G α_q und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	82
Abbildung 34: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals der unterschiedlichen GRK2-Varianten mit G $\beta\gamma$ sowie G α_q	84
Abbildung 35: Repräsentative FRET-Messung zwischen Cer-G β_1 und GRK2-YFP zur Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve	87
Abbildung 36: Konzentrations-Wirkungs-Kurven verschiedener FRET-Paare	88
Abbildung 37: GRK2-vermittelte, agonistabhängige Arrestin-Rekrutierung zum M $_3$ -AChR. 90	
Abbildung 38: Agonistabhängige Arrestin-Rekrutierung an den M $_3$ -AChR in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	91
Abbildung 39: Einfluss von G α_q auf die agonistabhängige Interaktion zwischen GRK2 und M $_2$ -AChR	94
Abbildung 40: Amplitude des FRET-Signals und Expressionslevel zwischen Cer-G β_1 und M $_3$ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	97
Abbildung 41: „Onset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Cer-G β_1 und M $_3$ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	98
Abbildung 42: „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Cer-G β_1 und M $_3$ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	100

Abbildung 43: Vergleich der „Offset“-Kinetik der FRET-Signale zwischen M ₃ -AChR und GRK2 bzw. Gβγ in Anwesenheit von GRK2	101
Abbildung 44: Amplitude des FRET-Signals und Expressionslevel zwischen CFP-Gγ ₂ und M ₃ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	102
Abbildung 45: Beispiel einer FRET-Messung zwischen M ₃ -AChR-YFP und Gα _q -CFP	103
Abbildung 46: Amplitude des FRET-Signals und Expressionslevel zwischen Gα _q -YFP und Cer-Gβ ₁ in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	105
Abbildung 47: Initiales FRET-Ratio zwischen Gα _q -YFP und Cer-Gβ ₁ in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	106
Abbildung 48: „Onset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Gα _q -YFP und Cer-Gβ ₁ in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	107
Abbildung 49: „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Gα _q -YFP und Cer-Gβ ₁ in Anwesenheit der unterschiedlichen GRK2-Varianten.....	109
Abbildung 50: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Aktivierung des G _q -Proteins und der G _q -Protein-GRK2 Interaktion	111
Abbildung 51: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Interaktion des M ₃ -ACh-Rezeptors mit GRK2 oder den GRK2-Mutanten	112
Abbildung 52: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Interaktion des M ₃ -ACh-Rezeptors mit Gβγ oder Arrestin3.....	113
Abbildung 53: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Gα _q -YFP und Cer-Gβ ₁ bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen.....	115

Abbildung 54: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen $G\alpha_q$ -YFP und GRK2-mTurq bzw. GRK2 (R587Q)-mTurq bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen.....	116
Abbildung 55: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen Cer- $G\beta_1$ und GRK2-YFP bzw. GRK2 (D110A)-YFP bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen.....	117
Abbildung 56: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M_3 -AChR-mTurq und YFP-markierter GRK2, GRK2 (D110A) oder GRK2 (R587Q) bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen.....	119
Abbildung 57: „Onset“- und „Offset“-Kinetik des FRET-Signals zwischen M_3 -AChR-YFP und Cer- $G\beta_1$ bei unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen	119
Abbildung 58: Eigenschaften von $G\alpha_q$ (P185K) im Vergleich zu Wildtyp- $G\alpha_q$ in verschiedenen FRET-Experimenten	121
Abbildung 59: Charakterisierung von $G\alpha_q$ (P185K) im Vergleich zum Wildtyp im FRET-Experiment zwischen $G\alpha_q$ -YFP und Cer- $G\beta_1$	122
Abbildung 60: Schematische Darstellung der Rekrutierung von GRK2 zum M_3 -AChR	132
Abbildung 61: Schematische Darstellung der Dissoziation der GRK2 vom M_3 -AChR.....	134

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 2: Allgemeine Reagenzien und Enzyme	28
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Enzyme für eukaryotische Zellkultur	30
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	31
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide	32
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Primer	34
Tabelle 7: Lösungen zur Durchführung einer DNA-Präparation (Mini)	41
Tabelle 8: Lösungen zur Durchführung einer Agarosegelelektrophorese	42
Tabelle 9: Lösungen für die Durchführung von Western-Blots	48
Tabelle 10: Auswertung der „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen M ₃ - AChR-YFP und den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	67
Tabelle 11: Auswertung der „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen M ₃ - AChR-mTurq und den unterschiedlichen GRK2-Varianten	72
Tabelle 12: Auswertung der „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen M ₃ -AChR-mTurq und GRK2-YFP ohne Überexpression von Gβγ, Gα _q oder des kompletten Heterotrimers	74
Tabelle 13: Auswertung der „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Interaktion der unterschiedlichen GRK2-Mutanten mit Gβγ sowie Gα _q	85
Tabelle 14: Vergleich der Interaktionskinetik von GRK2 (R587Q) und GRK2 (D110A) mit dem G _q -Protein sowie dem M ₃ -AChR	86
Tabelle 15: Auswertung der EC ₅₀ -Werte der in Abbildung 36 dargestellten Konzentrations- Wirkungs-Kurven	88

Tabelle 16: „Onset“- und „Offset“-Kinetik der Arrestin-Rekrutierung an den M ₃ -AChR in An- und Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen Mutanten....	92
Tabelle 17: Auswertung der „Onset“-Kinetik der Interaktion zwischen Cer-Gβ ₁ und M ₃ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	99
Tabelle 18: Auswertung der „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen Cer-Gβ ₁ und M ₃ -AChR-YFP in An- oder Abwesenheit von GRK2 oder den unterschiedlichen GRK2-Mutanten	100
Tabelle 19: Auswertung der „Onset“-Kinetik der Interaktion zwischen Gα _q -YFP und Cer-Gβ ₁ in Anwesenheit der unterschiedlichen GRK2-Varianten.....	108
Tabelle 20: Auswertung der „Offset“-Kinetik der Interaktion zwischen Gα _q -YFP und Cer-Gβ ₁ in Anwesenheit der unterschiedlichen GRK2-Varianten.....	109
Tabelle 21: Zusammenfassung der Kinetischen Daten	110
Tabelle 22: Auswertung der EC ₅₀ -Werte der in Abbildung 50, Abbildung 51 und Abbildung 52 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven	114

Publikationen

Manuskripte in Revision/ in Vorbereitung

Wolters V, Krasel C, Brockmann J, Bünemann M: Influence of $G\alpha_q$ on the dynamics of M_3 -ACh-receptor-GRK2 interaction. Akzeptiert bei *Molecular Pharmacology*

Wolters V, Hommers L, Bünemann M: Kinetic modelling of GRK2 recruitment to M_3 -ACh-receptor. In Vorbereitung

Poster

Wolters V, Bünemann M (2014) $G\alpha_q$ contributes to the recruitment of GRK2 to M_3 -ACh receptors. *Proceedings of the British Pharmacological Society*, 021P
<http://www.pa2online.org/abstract/abstract.jsp?abid=31424&period=56>

Wolters V, Bünemann M (2013) Dynamics of interaction between G_q -subunits and GRK2. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **386**, S93

Lebenslauf

Diese Seite enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Rekrutierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2 zum M₃-ACh-Rezeptor -
Identifizierung des Einflusses von Gα_q und Erstellung eines kinetischen Modells“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 14. Oktober 2014

.....
(Valerie Wolters)

Danksagungen

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Moritz Bünemann dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit zu diesem interessanten Thema in seinem Labor durchführen konnte. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion, zahlreiche Anregungen, das kritische Hinterfragen und seine großartige Unterstützung haben in erheblichem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen und Seminaren hat mir Einblicke in unterschiedliche Themengebiete gewährt und meine Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit gefördert.

Herrn Dr. Cornelius Krasel möchte ich für hilfreiche Antworten auf zahllose Fragen, wertvolle Ratschläge zu Klonierungen und FRET-Experimenten und das freundliche Bereitstellen von vielen DNA-Plasmiden danken.

Vielen Dank an Dr. Dr. Leif Hommers für die Kooperation zur Simulation von Reaktionskonstanten und seine ausdauernde Unterstützung im Kampf mit Virtual Cell.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Milde für die intensive Einarbeitung in die Eigenheiten des Nikon-Mikroskops, die FRET-Experimente und das Klonieren sowie für die vielen guten Ideen zur Lösung der aufgetretenen Schwierigkeiten.

Vielen herzlichen Dank auch an Anna-Lena Krett und Diana Zindel für viele hilfreiche Tipps zum Klonieren und ihre Unterstützung bei der Durchführung von Western-Blots.

Bei Sandra Engel möchte ich mich für die Einarbeitung in die Zellkultur und das Visitech-Setup sowie für ein offenes Ohr in allen Fragen bedanken.

Besonders danke ich auch Emma Esser für das sorgfältige Korrekturlesen meines Manuskripts und ihre freundliche Unterstützung bei allen organisatorischen Dingen.

Ulrich Korell danke ich für schnelle Hilfe bei zahlreichen kleineren und größeren technischen Schwierigkeiten im Laboralltag.

Herzlichen Dank allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, gegenseitige aufmerksame Unterstützung und zahlreiche Diskussionen.

Marcel Vonderau, Christian Barton, Haya Abdellah Ahmed, Katharina Nieswandt, Kathrin Pötschke und Birte Lukassowitz danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung im Wahlpflichtpraktikum und hoffe, dass es auch ihnen Spaß gemacht hat.

Zu guter Letzt danke ich herzlichst meinen Eltern und meinem Bruder, die den privaten Rückhalt für das Gelingen dieser Arbeit boten.